

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-506871

(P2001-506871A)

(43) 公表日 平成13年5月20日 (2001.5.20)

(51) Int.Cl. ¹	識別記号	P 1	7-73-1 ² (参考)
A 61 M 1/14	5 0 0	A 61 M 1/14	5 0 0
A 61 F 2/02		A 61 F 2/02	
C 12 N 5/08		G 01 N 33/15	Z
G 01 N 33/15		33/50	Z
33/50		C 12 N 5/00	E
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願平10-512833
(60) (22) 出願日	平成9年9月4日(1997.9.4)
(65) 開示文書出日	平成11年3月5日(1999.3.5)
(66) 国際出願番号	PCT/US97/15470
(67) 國際公開番号	WO98/09582
(68) 國際公開日	平成10年3月12日(1998.3.12)
(31) 優先権主張番号	6 0 / 0 2 5, 5 1 1
(32) 優先日	平成8年9月5日(1996.9.5)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	デルドレンズ・メディカル・センター・コ ーポレーション アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, ロングウッド・アベニュー 300
(72) 発明者	アラ, アンソニー アメリカ合衆国マサチューセッツ州02193, ウエストン, ウエスクリー・ロード 74
(72) 発明者	ヨー, ジエームズ・ジェイ アメリカ合衆国マサチューセッツ州02146, ブルックライン, チャペル・ストリート 20, アパートメント ピ-311
(74) 代理人	弁護士 村本 一夫 (外 5 頁)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工腎臓および腎臓疾患患者へのその利用

(57) 【要約】

本発明は、人工腎臓、人工腎臓を作成する方法、および人工腎臓により腎臓病の治療をする方法に関する。人工腎臓は外部表面にネフロン類似体を、そして血管からの尿を回収しそして排出するための排出チャンネルを備えた対向多孔性メンブレン構造を含む。メンブレン構造上に尿細管類似体を含有し、そして血管新生を誘導して糸球体様構造を形成するような接合を移植することにより、ネフロン類似体を調製する。多孔性メンブレン構造上に腎臓類似体を搭き、そしてこの複合体をin vitroにおいて培養することにより、尿細管類似体を調製する。

FIG. 2A

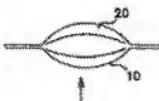


FIG. 2B

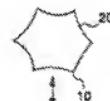


FIG. 2C

【特許請求の範囲】

1. 少なくとも一つの人工腎単位を含む人工腎臓であって、前記人工腎単位は少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外側表面を有する多孔性メンブレン構造を含み、そして前記メンブレン構造がさらにその外側表面に付着し、そして複数のネフロン類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行っており、前記各ネフロン類似体は血管新生を有し前記尿細管類似体の少なくとも一つの領域において糸球体様構造を形成する尿細管類似体を含み、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記集合体が前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔からなり、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子線を示す、前記人工腎臓。
2. 多孔性メンブレン構造が、ルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、請求項1の人工腎臓。
3. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項1の人工腎臓。
4. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項1の人工腎臓。
5. 多孔性メンブレン構造が直徑約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、請求項1の人工腎臓。

6. 多孔性メンブレン構造が直徑約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項1の人工腎臓。
7. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、請求項1の人工腎臓。
8. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、請求項7の人工腎臓。
9. 前記人工腎臓がin vivoまたはex vivoにおいて機能する、請求項1の人工腎臓。
10. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項1の人工腎臓。
11. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項1の人工腎臓。
12. 細胞集合体がフィプロネクチンを発現する、請求項1の人工腎臓。
13. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項1の人工腎臓。
14. 前記流出チャンネルが前記多孔性メンブレン構造中に体液が進入することを防ぐように位置取りされた非還流性バルブを含む、請求項1の人工腎臓。
15. 前記流出チャンネルが半多孔性のメンブレンバルブを含み、前記半多孔性メンブレンが微生物の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項1の人工腎臓。
16. 少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を含む人工腎単位であって、前記メンブレン構造がさらにその外部表面に付着しそして複数のネフロン類似体であるその封入された内部空間と液体伝達を行い、前記各ネフロン類似体は前記尿細管類似体の少なくとも一つの領域における糸球体構造を形成する血管新生を有する尿細管類似体を含み、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記集合体は前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す、前記人工腎単位。
17. 多孔性メンブレン構造が、ルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリ

アクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、請求項16の人工腎単位。

18. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項16の人工腎単位。

19. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項16の人工腎単位。

20. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、請求項16の人工腎単位。

21. 多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項16の人工腎単位。

22. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、請求項16の人工腎単位。

23. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、請求項16の人工腎単位。

24. 刷子線が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項16の人工腎単位。

25. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項16の人工腎単位。

26. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、請求項16の人工腎単位。

27. 前記人工腎単位がin vivoまたはex vivoにおいて機能する、請求項1

6の人工腎単位。

28. 前記人工腎単位が前記封入空間中に尿酸を排出する、請求項16の人工腎単位。

29. 封入内部空間を定める外部表面を有しそして少なくとも一つの流出チャネルを有する多孔性メンブレン構造を含む、追加的な腎臓機能を必要とする患者に対して移植するために適した人工腎単位前駆体であって、前記メンブレン構造がさらにその外部表面に付着しそしてさらに複数の尿細管類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行い、前記尿細管類似体が尿細管細胞の三次元集合体を含み、前記集合体が前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達をするための管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す、前記人工腎単位前駆体。

30. 多孔性メンブレン構造が、ルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

31. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

32. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項29の人工腎単位前駆体。

33. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔

を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

34. 多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

35. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

36. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、請求項35の人工腎単位前駆体。

37. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

38. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項29の人工腎単位前駆体。

39. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、請求項29の人工腎単位前駆体。

40. 前記人工腎単位が前記封入空間中に尿酸を排出する、請求項29の人工腎単位前駆体。

41. 以下の段階：

a) 少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を提供する段階；

b) 前記外部表面を腎臓組織細胞の懸濁物と接触させる段階；そして

c) 前記腎臓細胞をin vitroにおいて前記外部表面上で培養して複数の尿細管類似体を形成する段階であって、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元集合体を含み、前記集合体は前記メンブレン構造の封入空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す段階；

を含む、追加の腎臓機能を必要とする患者体内に移植するために適した人工腎単位前駆体を作成する方法。

42. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項41の方法。

43. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求

項41の方法。

44. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項41の方法。

45. 尿細管類似体がフィプロネクチンを発現する、請求項41の方法。

46. 尿細管細胞が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項41の方法。

47. 腎臓細胞が胎児腎臓細胞、または幼若体(juvenile)の腎臓細胞である、請求項41の方法。

48. 腎臓細胞が腎臓皮質由来である、請求項41の方法。

49. 腎臓細胞がヒトのものである、請求項41の方法。

50. 封入多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする、請求項41の方法。

51. 封入多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、請求項41の方法。

52. 封入多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項41の方法。

53. 以下の工程：

a) 患者体内の天然血管供給を有する領域に、請求項29の方法により作成した人工腎単位前駆体を移植する工程；

b) 天然血管供給を誘導して前記位置の領域において…またはそれ以上の糸球体様構造を形成する工程；そして

c) 前記メンブレン構造からの前記流出チャンネルを患者の泌尿器系に連結する工程；

を含む、前記患者において腎臓疾患を治療する方法。

54. 前記糸球体様構造が第VIII因子を発現する、請求項53の方法。

55. 流出チャンネルが前記患者の尿管に接続される、請求項53の方法。

56. 尿管が本来の尿管であるかまたは人工尿管である、請求項55の方法。

57. 内部空間を定める外部表面を有する生体適合性ポリマーの半透性膜を含む人工腎臓のための多孔性メンブレン構造であって、前記メンブレン構造がヘッ

ダーと液体伝達を行う複数の中空チューブを含み、そして前記ヘッダー上の流出チャンネルが前記内部空間のドレナージを可能にする、前記多孔性メンブレン構造。

58. 半透膜が多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

59. 半透膜が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項57の多孔性メンブレン構造。

60. 半透膜が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

61. 半透膜が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

62. 前記中空チューブが円形の横断面を有する、請求項57の多孔性メンブレン構造。

63. 円形状、單一コイル状、多重コイル (multiple coil) 状、渦巻き (spiral) 状、球状、らせん (helix) 状、多重ヘリックス状、楕円状、平面状、U字型、四角状、またはそれらの組合せの形状である、請求項57の多孔性メンブレン構造。

64. 前記流出チャンネルが前記多孔性メンブレン構造中に体液が進入することを防ぐように位置取りされた非還流性バルブを含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

65. 前記流出チャンネルが半多孔性のメンブレンバルブを含み、前記半多孔性メンブレンが微生物の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項57の多孔性メンブレン構造。

66. 前記多孔性メンブレン構造が機械的損傷から保護するための外側ケーシング (casing) をさらに含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

67. 流れ込み (amuent) チャンネルをさらに含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

68. 回収手段および前記流出チャンネルからの流出物貯蔵手段をさらに含む、請求項57の多孔性メンブレン構造。

6 9. 以下の段階：

- a) 腎臓組織を単離する段階；
- b) 前記腎臓組織を酵素的処理により分離して細胞懸濁物を形成する段階；
- c) 前記腎臓細胞懸濁物を *in vitro* において培養する段階；
- d) 封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質で処理する段階；
- e) 前記腎臓細胞を封入多孔性メンブレンの処理した外部表面上で培養して尿細管類似体を形成する段階であって、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体内に管腔を有する腎臓細胞の集合体内に管腔を含み、そして前記尿細管細胞は刷子縁を示す、前記段階；
を含む、尿細管類似体を作成する方法。

7 0. 細胞外マトリックスがコラーゲンを含む、請求項 6 9 の方法。

7 1. コラーゲンがラットの尾のコラーゲンである、請求項 6 9 の方法。

7 2. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項 6 9 の方法。

7 3. 細胞集合体がオステオボンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項 6 9 の方法。

7 4. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項 6 9 の方法。

7 5. 以下の段階：

- a) 封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質でコーティングする段階；
- b) 腎臓細胞懸濁物を前記物質上に播く段階；
- c) 前記腎臓細胞を前記封入多孔性メンブレン上で培養して尿細管を形成する段階であって、前記尿細管は内部に管腔を含む尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、そして前記尿細管細胞は刷子縁を示す、前記段階；
を含む、腎臓細胞上の物質の効果を測定する方法。

7 6. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項 7 5

の方法。

77. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項75の方法。

78. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、請求項75の方法。

79. 以下の段階：

a) 物質を尿細管類似体細胞培養物に接触させる段階であって、前記尿細管類似体は多孔性メンブレンが付着し内部に管腔を有する尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記尿細管が刷子線を示す、前記段階；そして

b) 前記腎臓細胞に対する物質の効果を決定する段階；
を含む、腎臓細胞に対する物質の効果を測定する方法。

80. 物質が薬物、医薬品、化学物質、微生物、化学物質、または元素である、請求項79の方法。

81. 刷子線が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項79の方法。

82. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項79の方法。

83. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、請求項79の方法。

【発明の詳細な説明】

人工腎臓および腎臓疾患治療へのその利用

背景

1. 発明の分野

本発明は人工腎臓(prosthetic kidney)、人工腎臓を作成する方法および人工腎臓を用いて腎臓疾患を治療する方法に向けられる。

2. 背景の説明

腎臓は血液から代謝廃棄物を除去し、ホメオスタシスを維持することにより体液バランスを調節し、そしてホルモンを分泌することにより重要な制御活性を提供する。通常、心臓により拍出された血液の約20%が腎臓により処理される。

ネフロンは、腎臓の機能単位であり、3つの過程により血液を処理する：すなわち、ろ過、再吸収および分泌である。それぞれの腎臓は、およそ100万個のネフロンを含み、それぞれのネフロンは腎小体および尿細管からなる。ネフロンの形状は、非常に長い回旋状の柄を持つ小型の漏斗に似ている。血液は糸球体を通じて腎小体に入る。血液からのろ過液は、ボーマン嚢とも呼ばれる糸球体嚢に入り、そして尿細管中を流れる。尿細管は4つの部分：すなわち、近位曲尿細管、ヘンリエ跡、遠位曲尿細管および集合管を含む。

腎小体は、糸球体と呼ばれる、からまる血液毛細管の一群を含み、糸球体は直径およそ200ミクロンで、糸球体嚢と呼ばれる薄い壁の袋状構造に囲まれている。血液は輸入および輸出細動脈を通して糸球体に入り、そして糸球体から出る。糸球体内では血圧により、糸球体ろ過液として、水およびさまざまな溶解物質が糸球体毛細管から糸球体嚢へとこし出される。

血漿、糸球体ろ過液および尿中のいくつかの物質の相対濃度を、表Iおよび表IIに示す。これらの値は、患者の液体消費量、投薬、年齢、食餌、健康状態および腎機能などの多くの要素に依存して変化しうる。

表 I

物質	血漿 (mEq/l)	糸球体ろ過液 (mEq/l)	尿 (mEq/l)
ナトリウム	142	142	128
カリウム	5	5	60
カルシウム	4	4	5
マグネシウム	3	3	15
塩素	103	103	134
炭酸水素塩	27	27	14
硫酸塩	1	1	33
リン酸塩	2	2	40

表 II

物質	血漿 (mg/100ml)	糸球体ろ過液 (mg/100ml)	尿 (mg/100ml)
グルコース	100	100	0
尿素	26	26	1820
尿酸	4	4	53
クレアチニン	1	1	196

糸球体ろ過の総速度は、典型的には、1人当たり1日約180リットルである。

この量のほとんどは、再吸収過程を経て、血流に戻される。再吸収は、物質が尿細管から出て血液に入る移動である。再吸収物質には、水、グルコースおよびその他の栄養素、ナトリウムおよびその他のイオンが含まれる。再吸収は近位曲尿細管で始まり、そしてヘンレ係蹄、遠位曲尿細管および集合管内で続く。

分泌は、遠位尿細管および尿細管の周囲の毛細管中の血液から、物質および液体が遠位尿細管および集合管へ移動する過程である。分泌される物質は、水素イオン、カリウムイオン、アンモニア、およびある種の薬剤である。尿細管分泌は体の酸／塩基バランスを維持するのにきわめて重要な役割を果たしている。

ホメオスタシスは、体により腎臓の機能に影響する特殊なホルモンによって維持されている。下垂体ホルモンADH（抗利尿ホルモン）は、遠位尿細管および集合管の水に対する透過性を持たせることにより、尿量を減少させる。副腎から分泌されるアルドステロンは、尿細管の塩およびその他の電解質の再吸収を調節する。主として、アルドステロンは尿細管を刺激し、ナトリウムをより速く再吸収

させる。

ホルモンは腎機能に作用するが、腎臓はまた、他の器官の機能を調節するホルモンを产生する。エリスロポエチンは腎細胞により分泌されるホルモンで、赤血球細胞形成速度を調節する。レニンは腎臓が分泌する第二のホルモンで、血圧を調節する。さらに腎臓は、骨格完全性(integrity)に関与するビタミンDを活性化する。

要約すると、血漿の糸球体ろ過、尿細管再吸収および尿細管分泌の結果、血液が処理され、そして尿が形成される。尿細管再吸収では、グルコース、アミノ酸、タンパク質、クレアチニン、乳酸、クエン酸、尿酸、アスコルビン酸、リン酸イオン、硫酸イオン、カルシウム、カリウムイオン、ナトリウムイオン、水および尿素が再吸収される。尿細管分泌では、ペニシリン、クレアチニン、ヒスタミン、フェノバルビタール、水素イオン、アンモニア、およびカリウムが分泌される。

患者の両方の腎臓が不全になると、血圧が上がる可能性があり、体液が体内にたまる可能性があり、廃棄物レベルが血液中において有害なレベルにまで増加する可能性があり、そして赤血球産生が減少する可能性がある。前記のことが起こると、不全の腎臓の機能を置き換える治療が必要になる。腎機能不全の治療には、血液透析、腹膜透析および腎移植が含まれる。

血液透析は、腎臓機能不全の患者の血液を清浄化しそしてろ過する治療法である。当該治療法により、有害廃棄物、余分な塩および体液のレベルが減少する。血液透析はまた、血圧を調節するのを助け、そして体内のカリウム、ナトリウム、および塩化物などの化学物質の適切なバランスを維持する。

血液透析は、透析機または特別なフィルターを用いて、血液を処理する。処理中、患者血液は管を通って体外の透析機に移動する。透析機は、廃棄物および余分な体液をこし出し、そして新たに清浄化された血液を体内に戻す。典型的な治療計画は、週に3回、1回2~4時間かかる血液透析治療を含んでもよい。治療中、移動は制限されるが、患者は読み書きなど、過剰な動きを必要としない活動に従事してもよい。

血液透析の不都合な点には、治療中に患者の体液および化学物質バランスが急速に変化することにより引き起こされる副作用および合併症が含まれる。筋肉の

痙攣および低血圧は2つのよく見られる副作用である。血圧の急激な低下である低血圧は極端な脱力感およびめまい感を引き起こす可能性がある。

患者が血液透析の副作用に適応するには普通、数か月を要する。副作用は、指示された通り、適切な食餌および薬剤消費に厳密に従うことにより、抑えられる可能性がある。適切な食餌は患者血液中に蓄積する廃棄物量を減少させ、そして腎臓の負荷を減少させるのを助ける。医師の指示に従って食餌計画を立てるのに栄養士の助けが必要である。

血液透析のさらなる不都合な点には、高い経費、およびしばしばかつ長時間透析施設に通わなくてはならないことが含まれる。透析施設の代わりに家庭で透析を行う方法もある。家庭での透析にはヘルパーが必要であり、そして患者およびヘルパー双方が、特別な訓練を受ける必要がある。さらに、機械および必需品を家庭に保管する場所が必要である。

腹膜透析は患者の腹部内層、腹膜を用い、血液をろ過する。透析液(dialysate)と呼ばれる浄化溶液を特殊な管を通じて患者の腹部へ移動させる。液体、廃棄物、および化学物質が、腹膜の小さな血管から透析液へと通過する。数時間後、透析液を腹部から排出させ、それと共に廃棄物を血液から除く。その後、腹部を新しい透析液で満たし、そして清浄化過程を再開する。

当該透析法には、さまざまな程度の困難および著しい治療時間が伴われる。治療計画はさまざまだが、一般に著しい不便な体勢をとる。典型的な治療計画は、例えば、4から6時間おきに30から40分、毎夜10から12時間、1週間に36から42時間、または24時間の治療期間を含む。さらに、透析に加え、特別な、カロリー制限カリウム制限食餌が必要となる。

腹膜透析の合併症としてありうるものには、腹膜炎、または腹膜感染が含まれる。腹膜透析法には、細菌などの病原体が体内に導入される可能性がある多くの段階が含まれる。腹膜炎の症状には、炎症、血清フィブリン細胞および膿の滲出、吐き気、めまい感、発熱、腹痛、圧痛、便秘および嘔吐が含まれる。腹膜炎を防ぐため、透析法に正確に従った医療が必要である。患者は腹膜炎の初期徴候を認識する訓練を受ける必要がある。素早い干渉に失敗すると、深刻な問題につながる可能性もある。

血液透析および腹膜透析には、短期の不便および副作用に加え、深刻な長期の合併症がある。骨疾患、高血圧、神経損傷、および貧血などの合併症は、時間と共に破壊的な影響を有する可能性がある。これらの合併症の結果、腎透析患者の60%は雇用されず、そして30%は身体障害者となっている。腎透析患者は概して、一般的な人々に比べ、生存期間がより短く、そして入院期間が5倍も長い。

腎移植は、ドナーの人から患者の体内に健康な腎臓を配置する方法である。移植された腎臓は、患者の不全になりつつある腎臓の血液ろ過容量を増大させるかまたは置換する。移植腎は大腿上部および腹部の間に配置される。新たな腎臓の動脈および静脈は、患者の動脈および静脈と連結され、そして新たな腎臓を通って血液が流れそして尿が作られる。依然として一部機能を持っている可能性がある患者自身の腎臓は、感染または高血圧を引き起こしているのでなければ、取り除かれない。

透析同様、組織非適合移植は治療法ではない。組織拒絶反応は、組織適合性が優れている場合であっても重大な危険である。シクロスボリンなどの薬剤に基づいた、拒絶を防ぐ免疫抑制治療計画は、ほとんどの移植後医療の基礎であり続けている。しかし、同一患者および患者間で薬物動態および薬力学が著しく変わりやすいことにより決定されるように、適切な免疫抑制と毒性との間の、薬剤免疫抑制の治療量行きの範囲が狭いため、効果的であるが、しかし毒性が最小である免疫抑制効果のある薬剤レベルを見つけるのは困難なものになっている。したがって、移植後医療はいまだに著しく高い経費および危険性を招く。

長期の免疫抑制剤消費により、副作用が引き起こされる可能性がある。最も深刻なのは、免疫系が弱まり、より容易に感染が発生することである。いくつかの薬剤はまた、体重増加、ざ瘡、顔の発毛、白内障、胃酸過剰、股関節疾患、肝臓または腎臓損傷を引き起こす。移植患者の食餌は、透析患者のものより制限が少ないが、それでも患者は何種類かの食物を減らす必要がある。免疫抑制剤でも腎臓拒絶反応を防げないこともある。拒絶反応が起これば、患者はある種の透析を受け、そしておそらく別の移植を待つ必要があるであろう。

腎ドナーを見つけるのにかかる時間はさまざまである。移植を必要とするすべての人に十分なほどの死体ドナーはなく、そしてこの問題は腎移植の症例では特

に深刻である。腎臓の別の供給源は、親戚および配偶者などの生存ドナーである。組織適合性がより優れているため、遺伝的に関係がある生存ドナーからの移植は、しばしば、死体ドナーからの移植よりもよく機能する。

Humes (米国特許第5,429,938号) は、*in vitro*の尿細管形成および*ex vivo*の尿細管構築のための腎細胞培養法を報告している。当該方法において、腫瘍増殖因子 β 1、上皮増殖因子および全トランス体レチノイン酸の存在下で腎細胞を培養し、三次元集合体を形成する。当該方法の不都合な点の中には、増殖因子を投与する必要があることおよび糸球体形成がないことがある。患者への増殖因子の投与は、望ましくない副作用および合併症を有する可能性がある。Humesは損傷を受けた腎組織の再増殖を助ける可能性がある方法を開示しているが、人工腎臓の構築法および使用法は開示されなかった。

半多孔性メンブレン (semiporous membrane) 構造に固定された肝臓 (Rozgaら, Hepatology 17, 258-65) および血液 (Schwartzら, Blood 78, 3155-61) 細胞増殖が報告されている。これらの器官構造は、体外で糸球体ろ過液の収集および体外への排出を考慮していないため、人工腎臓構築に適していない。

NaughtonおよびNaughton (米国特許第5,516,680号) は、三次元腎臓細胞および組織培養系を報告している。生存間質細胞の三次元構造は、間質支持マトリックスの上部に播かれる。腎細胞はこの三次元系の上部に重層され、そして培養される。

VacantiおよびLanger (WO 88/03785) は、生体分解性ポリマーの三次元ポリマー細胞骨格中で細胞を培養する方法を開示している。ポリマー細胞骨格中で培養された器官細胞は、患者体内に移植され、そして人工器官を形成する。

したがって、総合すると、腎臓培養の既知の方法は固有の欠点および欠陥を含み、そしてその設計の限界のため培養物を人工腎臓として使用する能力には特定の限界があることは、明白である。これら各方法は人工腎臓を構築する際に直面するいくつかの問題について述べようと試みてはいるものの、開示された方法で、血液をろ過し、糸球体ろ過、分泌、または再吸収を行うことが可能な現実の人工腎臓を構築する方法を示唆するものはない。

発明の概要

本発明は、腎機能障害および腎不全の治療に関する、現在の戦略および設計に関する問題および不都合な点を克服し、そして治療に関する方法および装置を提供する。

本発明の1つの態様は、少なくとも1つの人工腎単位(ARU)を含む人工腎臓に向けられる。人工腎単位は、少なくとも1つの流出チャンネルを有する封入内部空間の形を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を含み、そして当該メンブレン構造はさらにその外部表面に付着し、そして複数のネフロン類似体(analog)である封入内部空間と液体伝達を行っている。各ネフロン類似体は、尿細管類似体の少なくとも1つの領域に糸球体様構造を形成する、血管新生を有する尿細管類似体を含む。尿細管類似体は、尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、集合体はメンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔(lumen)を含み、そして集合体中の尿細管細胞は刷子縁(brush border)を示す。

本発明の別の態様は、少なくとも1つの流出チャンネルを有する封入内部空間の形を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を含み、そして当該メンブレン構造がさらにその外部表面に付着し、そして複数のネフロン類似体である封入内部空間と液体伝達を行うことを含む、人工腎単位に向けられる。各ネフロン類似体は、尿細管類似体の少なくとも1つの領域に糸球体様構造を形成する、血管新生を有する尿細管類似体を含む。尿細管類似体は、尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、集合体はメンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして尿細管細胞は刷子縁を示す。

本発明の別の態様は、付加的な腎機能が必要である患者に移植するのに適した人工腎単位前駆体であって、封入内部空間の形を定める外部表面を有し、そして少なくとも1つの流出チャンネルを有する多孔性メンブレン構造を含む前記前駆体に向けられる。当該メンブレン構造はさらにその外部表面に付着し、そして複数の尿細管類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行っている。尿細管類似体は、尿細管細胞の三次元集合体を含み、集合体はメンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして集合体中の尿細管細胞は刷子縁を示す。

本発明の別の態様は、付加的な腎機能が必要である患者に移植するのに適した人工腎単位を作成する方法であって、少なくとも1つの流出チャンネルを有する

封入内部空間の形を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を提供し；腎組織細胞の懸濁物と外部表面を接触させ；そしてin vitroの外部表面上で腎細胞を培養し、メンブレン構造の封入空間と液体伝達を行う管腔を含む尿細管細胞の三次元集合体を含む複数の尿細管類似体を形成し、そして集合体中の尿細管細胞は刷子線を示す、段階を含む、前記方法に向けられる。

本発明の別の態様は、患者の腎疾患を治療する、または腎機能を増大させる方法であって、患者の天然の血管供給がある領域に上述の人工腎単位前駆体を移植し；天然血管供給を誘導して1つの領域において糸球体様構造形成し；そしてメンブレン構造から患者の泌尿系に流出チャンネルを連結する、段階を含む、前記方法に向けられる。

本発明の別の態様は、人工腎臓の多孔性メンブレン構造であって、内部空間の形を定める外部表面を有する生体適合性ポリマーの半透性膜を含み、そしてメンブレン構造がヘッダーと液体伝達を行う複数の中空チューブおよび内部空間の排出を可能にするヘッダーへの流出チャンネルを含む、ことを含む、前記メンブレン構造に向けられる。

本発明の別の態様は、尿細管類似体を作成する方法であって、腎組織を単離し；腎組織を酵素処理により細胞懸濁物を形成するよう分離し；腎細胞懸濁物をin vitroで培養し；封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質で処理し；封入多孔性メンブレン構造の処理した外部表面上で腎細胞を培養し、尿細管類似体を形成させ、該尿細管類似体は三次元細胞集合体内部に管腔を含む尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み；そして尿細管細胞は刷子線を示す、段階を含む、前記方法に向けられる。

本発明の他の態様および利点は、一部は以下の説明で明らかにされ、そして一部は本説明から明らかとなるであろうし、そして本発明を実施することにより学ばれる可能性がある。

図面の説明

本特許の情報は、彩色して作成した図を少なくとも1つ含む。彩色図を含む本特許のコピーは、特許商標庁に請求し、そして必要な料金を支払うことにより提供されるであろう。

図1A-Bは、人工腎単位(ARU)または多孔性メンブレン構造のさまざまな折りたたみ可能な形状を示している。

図2A-Cは、人工腎単位ARUまたは多孔性メンブレン構造の膨張性の折りたたみ可能な形状を示している。

図3A-Jは、人工腎単位または多孔性メンブレン構造のさまざまな形状を示している。

図4は、集合管および貯蔵容器に連結された、孔サイズが4ミクロンのポリカーボネート細管膜からなる人工腎装置を示している。

図5は、人工腎単位切片の抗オステオポンチン抗体による免疫細胞化学染色を示している。

図6は、新たに形成された細管の細胞外マトリックス中のフィプロネクチンが均一に染色されているのを示している。

図7A-Bは、抗アルカリ性ホスファターゼ抗体により染色されたARU切片を示している。

図8A-Bは、糸球体様構造および異なる大きさの非常に組織化された細管様構造の形成を示す、移植ARU切片を示している。

発明の説明

本明細書中に例示され、そして広く記載されているように、本発明は人工腎臓、人工腎臓を作成する方法、および人工腎臓により腎臓疾患を治療する方法に向けられる。

腎疾患を治療するのに用いられてきた数多くの方法および装置は、それぞれ、腎機能をうまく増大させるために重要と認められる1つまたはそれ以上の問題の解決を試みてきた。これらの方法の例には、血液透析およびさまざまな型の腹膜透析が含まれる。しかし、これらの方法および装置はすべて、系の複雑さ、サイズおよび重さが大きいこと、長期間の治療または感染調節の困難さに関する問題に悩まされてきた。透析機および腹腔内透析などの、現在、腎疾患を治療する装置および方法に関する問題には、移動性が高く、適度の運動のための適切な腎機能、厳密な食餌計画からの自由、および感染、吐き気、搔痒、栄養不足、偽痛風、B型肝炎感染、心臓血管疾患の加速、高血圧、腎性骨形成異常、貧血、胸

水、血栓症、漿膜炎、心膜炎、透析腹水および透析痴呆などの合併症からの自由が得られる、質の高い生活を提供できないことが含まれる。

移植腎は、腎疾患を治療するための広く行き渡った基礎として、効果的に使用することが可能であり、そして長期間の生存が可能であることが立証されてきた。しかし、今日まで、1つの腎臓を必要とするすべての患者に対するドナー肝臓は不十分であり、そして広い適用に対し真に実用的な人工腎臓は開発されてこなかった。さらに、現在の腎移植患者には、患者免疫系の医学的管理を含む、非常に高度な追跡医療が必要である。

本発明の目的は、高いクオリティ・オブ・ライフを何年も維持することが可能な人工腎臓であって、腎臓疾患を治療する現時点の方法に関連する合併症、例えば嘔吐、感染、低血圧、痙攣、出血、白血球減少、低酸素症、電解質障害、および透析平衡異常および吐き気などの危険性が低い、前記人工腎臓を提供することである。

本発明の別の目的は、高い過速度で効果的に機能し、そしてしたがって占める容積がかなり小さい人工腎臓を提供することである。

本発明の別の目的は、患者に移植し、天然腎臓の機能を置換しまたは増大させる人工腎臓を提供することである。

本発明の別の目的は、患者自身の腎細胞またはドナーの細胞から人工腎臓を作成する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、本質的に組織適合性であり、耐久性があり、そして信頼できる、そして長期間に渡り血液をろ過することができる、人工腎臓を提供することである。

本発明の別の目的は、1つまたはそれ以上の構成要素が不全となった場合も、適切な腎機能を果たすことができる代理機能性（redundancy）を有する人工腎臓を提供することである。

本発明の別の目的は、生体分解性構造であって、人工腎臓を形成するための初期の構造的役割を果たし、そしてその後、生体分解性構造が分解されるにつれ組織増殖を促進してもよい前記構造を含む、人工腎臓を提供することである。

本発明の別の目的は、流出ドレナージおよび収集系を備えた人工腎臓を提供す

ることである。

本発明の1つの態様は、1つまたはそれ以上の人工腎単位(ARU)を含む人工腎臓に向けられる。こうした装置を作成する1つの好ましい過程を、ここに記載する。

腎細胞の採取

ARUは一部、ドナーからの腎細胞を用いて構築される。自家人工腎臓では、腎細胞が患者自身の腎臓に由来していてもよい。同種異系人工腎臓では、腎細胞が患者の種の他のメンバー由来であってもよい。異種人工腎臓では、腎細胞が患者とは異なる種由来であってもよい。ドナー細胞は、例えばヒト、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギおよびヒツジなどの多くの哺乳動物供給源の腎皮質由来であってもよい。腎細胞は生検または死体解剖により単離してもよい。さらに、細胞は使用前に凍結するか、または培殖させててもよい。

ARU構築の準備として、腎臓または腎組織切片を分離して細胞懸濁物とする(実施例1)。1週間など、ある程度の期間in vitro培養を行った後、単一細胞懸濁に至る可能性があるため、初めの初代培養に細胞を単一細胞段階にまで分離するの必要不可欠ではない。組織分離は、細胞外マトリックスおよび細胞を共につなぎ合わせている細胞間結合を、機械的および酵素的に破壊することにより行ってもよい。胎児、新生児、幼児から成人まで、あらゆる発生段階由来の腎細胞を使用してもよい。胎児または新生児組織からは、より高い収率で細胞が得られる可能性がある。

細胞へのストレスを減少し、そして扱いを容易にするため、破壊前に、腎組織切片を平衡化塩溶液に置いてもよい。平衡化塩溶液には、組織培養培地、ハンクス平衡化塩溶液およびリン酸緩衝生理食塩水およびそれに匹敵するものなどがあり、Gibco(メリーランド州ゲティスピーグ)およびSigma(ミズーリ州セントルイス)などの商業的供給源から入手可能である。腎組織は外科用メス、針、はさみまたは細胞分離ふるい(Sigma, ミズーリ州セントルイス)などの機械的組織破壊装置により破壊してもよい。機械的破壊の後、組織はさらに、トリプシン、コラゲナーゼ、ディスパーゼなどのタンパク質分解酵素により酵素的に、そしてエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのカルシウムイオンに結合するまたはカル

シウムイオンをキレートする薬剤により、処理してもよい。カルシウムキレート剤は細胞細胞接着が依存するカルシウムイオンの生物学的利用能を除去する。

細胞生存率を維持するため、酵素の分離は、目または顕微鏡によりモニターしてもよい。望ましい分離が得られた後だが細胞生存率が実質的に損なわれる前に、酵素を失活させてもよい。酵素失活は、等張液洗浄または血清処理により行つてもよい。

初代培養は、細胞分画段階を含みまたは含まず分離した細胞から調製してもよい。細胞分画は、当業者に知られる蛍光表示式細胞分取法などの技術を用いて行ってもよい。細胞分画は、細胞の大きさ、DNA含有量、細胞表面抗原、および生存率に基づいて行ってもよい。例えば、細管細胞を濃縮してもよく、そして纖維芽細胞を減少させてもよい。細胞分画を用いてもよいが、本発明の実行に必要ではない。

細胞分取は、例えば、ドナーが腎臓癌またはその他の癌の腎臓への転移などの疾患を有するときなどに、望ましい可能性がある。腎細胞集団は悪性腎細胞または他の腫瘍細胞を、正常非癌腎細胞から分離するために分取してもよい。1つまたはそれ以上の分取技術により単離された正常非癌腎細胞を、人工腎臓を产生するために使用してもよい。

当該方法の別の任意の方法は、凍結保存である。凍結保存は、例えば、複数回の侵入的外科的方法の必要を減らすため、有用である可能性がある。腎臓から得られた細胞を増幅し、そして増幅された細胞の一部を使用してもよく、そして別の一部を凍結保存してもよい。細胞を増幅そして保存することができれば、ドナー細胞の選択にかなりの柔軟性が生まれる。例えば、組織適合するドナーからの細胞を増幅し、1人以上のレシピエントに利用してもよい。凍結保存および増幅のさらなる利点は、1つの腎臓由来の細胞を増幅し、第二の腎臓を产生してもよいことである。

凍結保存の利用の別の例は、組織バンクである。ドナー細胞を組織適合性データと共に凍結保存してもよい。ドナー細胞は、例えば、ドナー組織バンクに貯蔵される。患者の腎臓疾患を治療するのに組織が必要とされると、患者に最も組織適合する細胞を選択することが可能である。腎臓に危険が及ぶ可能性がある疾患

を有するかまたはそうした可能性がある治療を受ける患者は、自らの腎臓の生検を凍結保存してもよい。後に、患者自身の腎臓が衰えたならば、凍結保存された腎細胞を融解し、治療に用いてもよい。腎臓に損傷を与える疾患の例には、例えば、高血圧および糖尿病が含まれる。腎臓に損傷を与える治療法の例には、例えば、化学療法および放射線療法が含まれる。

腎細胞の培養

ARUを開始するに十分な材料を産生するため多くの細胞を増幅するのが望ましい可能性がある。増幅することにより、必要とされるドナー組織量を減らせるなどの利点がある。たとえば、生存ドナーから小さな腎生検切片を除いてもよい。除かれる組織は、ドナーの腎機能および能力を実質的に減少させないほど小さくてもよい。除かれた腎生検切片を増幅し、1人またはそれ以上の患者に人工腎臓を提供してもよい。自家移植であって、患者がすでにかなり腎損傷を受けている場合など、いくつかの状況では、腎細胞を増幅し、そしてARUを再生することができれば、かなりの利点を有する。

細胞増幅は、細胞を何度も引き続き、より大きなまたはより多くの培養容器に継代培養することにより、行ってもよい。細胞は何週間、何ヶ月および何年も連続して継代培養してもよい。したがって、腎臓の小さな切片1つ、例えば生検による1グラム未満の組織を、連続培養後、ARU構築に使用する約10グラム、約50グラム、約200グラムまたはそれ以上の組織に増やすことも可能である。

1つの好ましい態様において、実施例2および3で論じられる条件下で、細胞を培養し、そして増幅する。簡潔には、全ての細胞をコラーゲン処理したプレート上で、約10%のウシ胎児血清、約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウシインシリン、約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトランスフェリン、約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜セレン酸ナトリウム、約0.5 μl のヒドロコルチゾン、約10ng/mlのプロスタグランジンE₂、約100ユニット/mlのベニシリンG、約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを補ったダルベッコの修飾イーグル培地中で、約37°Cおよび約5%CO₂のインキュベーターで培養する。すべての培地および試薬は、例えばミズーリ州セントルイスのSigmaなどの組織培養供給源から商業的に購入してもよい。

他の培地、例えば、MCDB、199、CMPL、RPMI、F10、F-12、MEMおよびそれに匹

敵する培地は、Gibco(メリーランド州ゲティスバーグ)およびSigma(ミズーリ州セントルイス)などの商業的供給源から入手可能であり、これらを腎細胞の培養に使用してもよい。補助剤(supplement)もまた、血清濃度を例えれば、約15%、約20%、約30%、約40%、または約50%などに増加して補ってもよい。さまざまな哺乳動物細胞に適した培地、血清、平衡化塩溶液、および補助剤の組成は、本明細書に援用されるGibco(メリーランド州ゲティスバーグ)およびSigma(ミズーリ州セントルイス)カタログに掲載されている。

培地および生存腎細胞を長期間維持するのに使用するマトリックスは、これらの細胞がホルモンに反応する状態に保持されるよう、選択しなくてはならない。少量のインシュリン、ヒドロコルチゾンおよびレチノイン酸は、細胞が尿細管類似体および人工腎単位を形成できるよう維持するのに、望ましい。インシュリン、ヒドロコルチゾンおよびレチノイン酸は、特に、細胞増幅中に遭遇するより長く培養される場合に望ましい。

多孔性メンブレン構造

本発明のARUは、封入多孔性メンブレン構造を含む。この多孔性メンブレン構造は、封入内部空間および少なくとも1つの流出チャンネルの形を定める外部表面と共に、多孔膜を含む。後述するように、尿細管類似体は多孔性メンブレン構造の外部表面上に形成される。本発明の最も単純な態様において、当該メンブレン構造は両端が堅く閉じられた中空チューブである。流出チャンネルは、封入管に結合し、内部空間の排出を行ってもよい。

本発明の多孔性メンブレン構造はまた、例えば、複数の中空チューブまたは中空繊維であって、それぞれが一端で閉じられ、そして別の端でヘッダーと液体伝達を行っててもよい。中空繊維は商業的に購入してもよく、そして細胞培養のための中空繊維構築は当業者によく知られている。中空繊維製造の1つの方法は、膜ポリマーを細かいダイス型に突き出し、管が堅くなり、そして非常に孔が多い管を形成することを含む。数百から数千、数万の繊維をヘッダーに連結してもよい。さらに、複数のヘッダーを液体路によりつなぎ、人工腎臓のための超構造を形成してもよい。中空繊維構築は、広い表面を容積率にして比較的小さい容積に包み込むことが可能である。

別の多孔性メンブレン構造は、両端が開放された複数の中空多孔管または繊維を含み、そして一端は第一のヘッダーと液体伝達があり、他の端は第二のヘッダーと液体伝達があつてもよい。この設計では、多孔性メンブレン構造を通して押し流すこと (flushing) または液体を一掃することができる可能性がある。押し流すことにより、多孔性メンブレン構造の使用前および使用中の、清浄化、消毒、治療、または薬剤または化学物質の供給ができる可能性がある。

多孔性メンブレン構造はまた、粒子を焼結融合 (sintering-fusion) させ、三次構造を形成させることによって構築してもよい。多孔性メンブレン構造のその他の構築法には、ケーシング(casing)、伸張(stretching)、滲出(leaching)、核生成(nucleation)、およびレーザーによる製造が含まれる。ケーシングでは、ポリマーおよび溶剤を含む溶液の薄いフィルムを、時に布または紙の基盤の上に成形 (cast) する。溶剤は流れ去り、そしてポリマー沈殿により多孔形成が起こる。伸張では、テフロン[®]、ポリプロピレン、またはその他のポリマーシートを、均等にすべての方向に引き伸ばし、規則正しい多孔を生成する。滲出では、2つの構成要素を含む溶液をフィルム状に伸ばす。次に溶剤を用い、1つの構成要素を分解し去ることで、多孔が形成される(本明細書に援用されるMikos、米国特許第5,514,378号を参照されたい)。核生成では、薄いポリカーボネート膜を放射性核分裂産物に曝露し、放射損傷成分の軌道を生成する。次に当該ポリカーボネートシートを酸または塩基でエッチングし、放射損傷物質を孔にする。最後に、レーザーを使用し、多くの物質に個別に穴を焼ききり、多孔性メンブレン構造を形成してもよい。レーザーによる製造では、ポリマー材に加え、金属、ガラス、およびセラミックスを用いて多孔性メンブレン構造を形成してもよい。いずれの製造法の後でも、電子顕微鏡を用いて、品質管理およびメンブレン構造の決定を行ってもよい。

多孔性メンブレン構造は、天然または合成生体適合性ポリマー材、例えばセルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエー

テル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素一ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたは物理的混合物などを用いて製造してもよい。ポリマー材は体液および宿主細胞の攻撃に適合し、そして抵抗性があるものを選択しなくてはならない。さらに、当該ポリマー材は、腎臓疾患または患者がやはり有している可能性がある他のいずれの疾患の治療の一部として、患者がさらされる可能性がある薬剤または化学療法物質などの、いかなる薬剤または化学物質の攻撃にも抵抗性があることが好ましい。

多孔性メンブレン構造材は、生分解性であり、そして体内でゆっくり分解されるよう設計されてもよい。生分解性物質はまた、人工腎臓形成における初期構造の役割を果たし、そしてその後、それらが分解されると共に、組織増殖を促進してもよい。さらに、生分解性物質およびその分解産物は毒性がなく、そして容易に疾患患者または健常患者の系から除去することが可能であることが好ましい。生分解性構造を形成する代表的な物質には、天然または合成ポリマーが含まれ、例えば、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリオルトエステルおよびポリ無水物などのポリ(アルファエステル)およびそれらのコポリマーがあり、調節された速度で加水分解により分解され、そして再吸収される。これらの物質は、分解性、扱いやすさ、大きさおよび形状に関し最大限の調節を提供する。

多孔性メンブレン構造上の孔は、液体および気体が通過するに十分な大きさだが細胞を透過しない程度の小ささでなくてはならない。この目的を達成するに適した孔の大きさは、直徑約0.04ミクロンから約10ミクロンであってもよく、好ましくは直徑約0.4ミクロンから約4ミクロンの間である。ポリカーボネット膜は、特に適切である。例えば、約0.01ミクロン、約0.05ミクロン、約0.1ミクロン、約0.2ミクロン、約0.45ミクロン、約0.6ミクロン、約1.0ミクロン、約2.0ミクロンおよび約4.0ミクロンなどの非常に調節された孔の大きさで製造

することが可能であるからである。1ミクロン未満のレベルでは、多孔膜は、細菌、ウイルス、および他の微生物を通さない可能性がある。

多孔性メンブレン構造は、完全に多孔であっても、または部分的に多孔であってもよい。多孔性メンブレン構造の領域が非多孔であることが望ましい可能性もある。非多孔領域には、例えば、蝶つがい領域、構造領域、輸出および輸入ポート、接続部および結合部位が含まれる可能性がある。

流出チャンネルは、多孔性メンブレン構造中のいかなる排出開口部でもよく、例えば、ノズル、管、型、穴、または液体が多孔性メンブレン構造の内部空間から出てもよいような開口部またはそれに匹敵するものなどがある。所望により、一般にチェックバルブとして知られる、非逆流バルブを流出チャンネルに取り入れて、輸出液が多孔性メンブレン構造に逆流するのを防いでもよい。液体が通過するのに十分な大きさであるが、微生物が通過するのを防げるほど小さい孔を有するフィルターを流出チャンネルに加え、人工腎臓の感染可能性を防ぎまたは減少させてもよい。所望により、輸出液を収集しそして貯蔵する手段、例えば人工膀胱、中空チューブまたはそれに匹敵するものを、流出チャンネルまたは多孔性メンブレン構造に連結してもよい。輸出液は、排出期間の間またはその後の分析のために保ててもよい。

多孔性メンブレン構造は、折りたたみ可能な構造、例えば図1に示される構造であってもよい。折りたたみ可能な構造は、1つの形状に展開し(deploy)、そして第二のよりコンパクトな形状に収縮させることができる構造すべてである。図1には、形状を変換することが可能な構造の例が含まれる。例えば、平面から球根状に(図1A)、延長型かららせんに(図1B)、延長型から超らせんに(図1C)、および筒型からふいご型構造に(図1D)などである。展開された形状は、腎細胞を植え付ける、または移植するのにより適している可能性があり、一方収縮された形状は長期の移植により適している可能性がある。折りたたみ可能な多孔性メンブレン構造の展開された形状は、例えば、長いまたは平たい筒(図3A、3G)、延長型管(図3B、3E)、コイル(図3J)、らせん(図1Bおよび3C)、二重または多重らせん(図1C)、腎臓型(図3D)、立方体(図3H)、平たい袋(図3I)、またはそれらの組み合わせであってもよい。多孔性メンブレン構造はさらに、移植前

または移植後の構造の変形および成形のため、ふいご10(図1D)、管、ひもまたはワイヤ20(図1D)を含んでもよい。さらに、多孔性メンブレン構造は、完全性を維持しそしてARU細胞の柱による壊死を防ぐための支持体を含んでもよい。こうした支持体は、多孔性メンブレン構造に結合していくてもしていなくてもよく、そしてその内部または外部にあってもよい、柱、リブ(rib)、またはそれに匹敵するものを含んでもよい。折りたたみ可能な多孔性メンブレン構造の収縮された形状は、より複雑であることを除けば展開された形状に類似であってもよい。その他の収縮された形状は、平面、球体および腎臓型を含んでもよい。他の望ましい折りたたみ可能構造は、患者の皮下にまたは腹部または胸部に適するように設計された収縮された形状を含んでもよい。

人工腎臓に適した折りたたみ可能な構造の例には、アコーディオン様またはふいご型の折りたたみ可能構造(図2C)が含まれ、最も好ましくは多孔生物適合性ポリマーで形成される。折りたためみ可能な多孔性メンブレン構造は、腎細胞が付着する間、展開されてもよい。その後、展開された形状の折りたたみ可能構造を、患者に移植してもよい。患者の血管新生活動が人工腎臓を灌流する際、構造はゆっくりと収縮する可能性がある。また別に、腎細胞付着後、構造を収縮しそして患者に移植してもよい。折りたたみ可能な三次元多孔性メンブレン構造は、さまざまな形で開発してもよい。三次元折りたたみ可能メンブレン構造が、望ましい最終時および初期構造を有することが好ましい。望ましい構造は、人工腎臓の移植位置により決定される。皮下に移植されるよう設計された人工腎臓は、平面であってもよく、正規の腎臓と置換する人工腎臓は、腎臓型であってもよい。他の設計上考慮する点は、当該構造が折りたたまれたまたは展開された状態のいずれであっても、分解または構成要素の衰えを引き起こさず展開可能でなくてはならないことである。例えば、こうした構造は構造完全性を維持し、そして広がった状態および折りたたまれた状態で、人工腎臓への血液供給を遮断するまたは減少させる可能性がある閉塞を起こさないことが望ましい。

折りたたみ可能な多孔性メンブレン構造を形成する別の方法は、膨張性構造(図2A、2B、および2C)である。例えば、膨張性折りたたみ構造およびその対応する横断面構造の1つの態様を、それぞれ図2Aおよび2Bに示す。当該構造は、柔

軟であるが実質的に非伸縮性でそして横断面が凸である壁20を有する膨張体10を含んでもよい。横断面が凸である壁は、伸張し、そしてになりまたは凹であるよう適応させてもよく、そしてしたがってその幅に沿って柔軟性がある。膨張性構造は、腎細胞を植え付けるために膨張させてもよく、そして移植前または移植後のいずれかにしほませてもよい。膨張性折りたたみ可能メンブレン構造の他の態様は、アコードィオン型であり、そして図2Cに示されている。

封入多孔性メンブレン構造は、所望により、ARUに機械的損傷を与えるのを防ぐにたる強度を持った、変形可能な外部外被 (casing) を含んでもよい。変形可能な外被は、いくつでもよい望ましい形状に成形し、いくつでもよい全体系、構造または空間的制約を満足させてもよい。変形可能な外被は、フィルム、ガーゼ、帶紐、ワイヤメッシュ、布、フォームラバー、およびそれに匹敵するもので形成されてもよい。外被を構築するのに適した材料には、例えば、鋼鉄、チタンのような金属、ガラス、ポリマー、グラスファイバー、プラスチックまたはそれらに匹敵するものが含まれる。外部外被を有する多孔性メンブレン構造の最終的形状は、例えば、筒(図3A、3B、3C)、コイル(図3J)、らせん(図3C)、二重または多重らせん(図1C)、腎臓型(図3D)、立方体(図3H)、平たい袋(図3I)またはそれらの組み合わせ(図4)であってもよい。変形度の唯一の制限は、多孔性メンブレン構造およびそれに関連するARUの重要な領域が、人工腎臓の腎機能が損なわれ、減少し、またはそうでなければ有害な影響を受けるほど、著しく破損し、伸張し、ひだをつけられ、または過剰なストレス、圧力、または圧迫下に置かれることがないことである。

本発明の態様において、多孔性メンブレン構造を、放射線療法が人工腎臓の腎機能を好ましくなく改変しないように、放射線耐性である材質で作成してもよい。ある疾患、例えば腎臓癌などの治療においては、放射線を手術後に適用することが必要とされる可能性がある。放射線耐性多孔性メンブレン構造により、必要であれば、残った腫瘍の治療部位で、人工腎臓に重い放射線を当てることが可能になるであろう。

本発明の態様において、多孔性メンブレン構造は超音波耐性である材質で作成される。泌尿系中の結石 (calculi) 蓄積および被覆、例えば腎結石は、腎能力

が低下した患者にはよく見られる問題である。結石蓄積、被覆および石(stone)の1つの治療法は、超音波エネルギーを用いて蓄積物を破壊することである。超音波耐性多孔性メンブレン構造により、人工腎臓を好ましくなく改変することなく、移植後に超音波治療を行うことが可能になるであろう。

本発明の別の態様は、薬剤、増殖因子を送り込む手段、および多孔性メンブレン構造への輸入路を少なくとも1つ提供することにより、人工腎単位(ARU)の多孔性メンブレン構造中の結石蓄積および被覆を抑制する手段に向けられる。輸入路は、固体、液体または気体を多孔性メンブレン構造に導入することが可能になる、いかなる手段、例えばポートまたは型であってもよい。輸入路は、流出チャネルから遠位の点に置き、導入された液体が実質的に多孔性メンブレン構造の全内部表面を通過し、流出チャネルから出て行くようにしてもよい。

当業者には、トランスフォーミング増殖因子 β 、上皮増殖因子、および全トランス体レチノイン酸などの増殖因子の組み合わせが、尿細管形成を誘導する可能性があることが知られている。また、クエン酸カリウムおよびアセトヒドロキサミン酸などのさまざまな化学物質および薬剤が、ほとんど溶けないカルシウムおよびマグネシウム塩の結晶化を阻害することも知られている。抗生物質および金属化合物などのさまざまな化学物質および薬剤が、微生物の生長を阻害するか、または殺す可能性があることが知られている。増殖因子、抗被覆因子、および抗生物質を、輸入路から液体の形で多孔性メンブレン構造に加えてもよい。輸入路はさらに、例えばARUから皮下部位に伸長する管を含んでもよい。例えば、腹部ARUを持つ患者への増殖因子、抗被覆因子、および抗生物質の添加は、皮下に移植された注入ポートに皮下針を連結することにより、容易に達成できる可能性がある。

本発明の1つの態様は、in vitroで尿細管類似体が生長および発達するため、多孔性メンブレン構造上に細胞外マトリックス成分で覆うことを提供する。ARU構築のための腎細胞の急速な三次元増殖は、細胞が落ち着きそして再生することが可能な生物成分マトリックスが入手可能であれば容易になる可能性がある。したがって、多孔性メンブレン構造の外部表面を、細胞外マトリックスタンパク質のような、細胞増殖制御の適切な情報を与える成分で処理することが好ましい可

能性がある。

細胞外マトリックスタンパク質には、糖タンパク質、プロテオグリカンおよびコラーゲンが含まれる。多孔性メンブレン構造の外部表面は、これらタンパク質の1つまたは組み合わせにより処理してもよい。使用してもよい適切な細胞外タンパク質の例には、コラーゲン、フィプロネクチン、トロンボスponジン、サイトアクチン、エキノネクチン、エンタクチン、ラミニン、テネイシン、ウボモリン、ピトロネクチン、ピグリカン、コンドロイチン硫酸、デコリン、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸およびヒアルロン酸が含まれる。

細胞外マトリックスタンパク質は、ラット尾などの哺乳動物供給源から新たに抽出してもよい。コラーゲンのその他の哺乳動物供給源には、ウシ、ブタおよびヒトの供給源が含まれる。コラーゲンなどのヒト細胞外タンパク質は、胎盤または死体などのヒト組織から集めてもよく、そしてSigma (ミズーリ州セントルイス)などの商業的供給者から購入してもよい。

細胞外マトリックスタンパク質および多孔性メンブレン構造は、使用前に殺菌してもよい。殺菌は、細胞外マトリックスタンパク質に微生物が混入する可能性を減少させる可能性がある。殺菌の好ましい方法には、限外ろ過および放射線曝露が含まれる。放射線曝露は、例えば、ガンマ線またはX線曝露であってもよい。また別に、抗生物質、抗細菌および細胞毒性剤、普通に効果的な用語の紫外線照射を使用してもよい。用いられる好ましい細胞毒性剤の1つは、エチレンオキシドである。

多孔性メンブレン構造の表面処理は、ECMタンパク質溶液と多孔性メンブレン構造を接触させることを含んでもよい。接触後、例えば水酸化アンモニウムによりpHを上げて、結合、ゲル化、ポリマー化を促進してもよい。また別に、細胞外マトリックスタンパク質を多孔性メンブレン構造にクロスリンクしてもよい。クロスリンクおよび誘導体化試薬は、Pierce (イリノイ州ロックフォード) などの商業的供給者から購入してもよい。

多孔性メンブレン構造上への腎細胞の植付け

腎細胞の多孔性メンブレン構造外部表面への付着は、分離した腎細胞を多孔性メンブレン構造と結合させることにより達成してもよい。好ましい方法の1つが

実施例3に詳細に記載される。簡潔には、多孔性メンブレン構造表面1平方センチメートル当たり約 1×10^7 の細胞密度で、腎細胞懸濁と多孔性メンブレン構造を穏やかに接触させる。覆われた多孔性メンブレン構造を、約100%の湿度、約37°C、約5%CO₂下の組織培養インキュベーター中で、約30分から約1時間インキュベーションする。この期間の後、培地を穏やかに加え、多孔性メンブレン構造を完全に沈める。

多孔性メンブレン構造上の細胞外膜タンパク質は、腎細胞の付着を促進する可能性があり、そしてこの付着は実質的に、約30分から約24時間以内、例えば1時間、2時間、4時間、8時間または16時間以内に完成する。完全付着に要する正確な時間は、多孔性メンブレン構造の表面特性および表面組成物、培地、および細胞外マトリックスおよび当該腎細胞に依存する。

尿細管類似体を形成するための多孔性メンブレン構造上での腎細胞の培養

付着後、腎細胞を含む構造を、尿細管類似体を形成するに足る時間および条件下でin vitroで培養する。例えば、約5%CO₂および約37°C下で約3日から約20日、好ましくは約7から約10日の間培養すれば、一般には十分である。多孔性メンブレン構造を覆う培地は、約1日から約6日の時間間隔、好ましくは2日から5日の間、より好ましくは3日から4日の間で必要に応じて交換してもよい。培地交換の間隔は、培地の容積および培地中の栄養素の消費速度および廃棄産物の集積速度に依存する。培地の容積を調整することで、培地交換の間を、7日、8日、9日または10日などのより長い期間にすることも可能であると理解されている。ウシ血清、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ヒドロコルチゾン、プロスタグランジンE₂、ペニシリン、およびストレプトマイシンなどの栄養素、抗生物質およびホルモンを付加することで、培地交換の期間を延長することも可能であると理解されている。

細胞外マトリックスタンパク質処理により、多孔性メンブレン構造表面特性が変化し、付着細胞形態および移動に影響を与える。処理した多孔性メンブレン構造上で培養すると、腎細胞はまず単層で広がるが、時間と共に自発的に自己集合

し、それぞれ内部管腔を含む三次元細胞集合体になる。細胞集合体の形状は尿細

管の直線状部分に似ている。細胞集合体は支持体に付着し、そして細胞細胞境界が事実上区別できない滑らかな表面を有する。尿細管類似体は、一端が開放されてもまた閉じていてもよい。1細胞当たりを基準とすると、尿細管類似体は、腎細胞単層と比較して、より高い腎臓特異的活性を示し、そしてより長い間生存可能である。細管細胞に特異的な細胞機能には、分泌、吸収、および、アルカリ性ホスファターゼ(図7AおよびB)およびオステオポンチン(図5)などの細胞特異的遺伝子産物発現が含まれ、そして単層の腎細胞より、より組織に似た超構造を示す。

尿細管類似体の多孔性メンブレン構造上の自己集合の過程で発展する腎特異的活性を、表現型上および機能上モニターを行ってもよい。表現型としては、尿細管類似体は、天然細管に似た刷子線、管腔、および細胞結合などの特徴を有する。オステオポンチンおよびアルカリ性ホスファターゼなどの尿細管特異的遺伝子発現は、ノーザンプロット、ウェスタンプロット、ポリメラーゼ連鎖反応およびin situハイブリダイゼーションなど、当業者に知られるいかなる分子生物学的または免疫学的方法により、モニターしてもよい。グルコース代謝を調べる過ヨウ素酸シップ(PAS)試験など、腎近位細管細胞に局在する活性に対する試験を用いて、腎近位表現型を検出してもよい。

腎近位尿細管は、多孔性メンブレン構造表面上に橢円から伸長した型の細胞の連続シートを形成することが観察された。植付け24時間後当初は、多孔性メンブレン構造上の腎細胞は、厚さが一細胞層であるが、集密(confluence)に近づくにつれ、複数細胞層である領域が見られる可能性がある。尿細管類似体のそれぞれの細胞は、明確な1つまたは2つの仁を持つ、目立つ丸い核を有する。細胞内空間は細胞内ブリッジに似た領域で付着する細胞では大きい。いくつかの領域では、細胞表面内への折りたたみまたはポケットが目立つ。いくつかの細胞は、多數の顆粒、おそらくリソソームを含む。これは近位尿細管細胞の特徴である。この細胞の顆粒化は、7日以上の培養体で有意に増加した。

顕微鏡下で調べると、尿細管類似体は、天然の細管同様、刷子線に似た、細胞

表面からの長細い微絨毛突起に満たされた広い細胞内空間を示す。刷子縁は線条縁とも呼ばれるが、近位尿細管細胞の頂端表面に特有な特徴である。顕微鏡で

は、刷子縁は細胞の接着していない表面の特殊化として現れ、表面領域を非常に増加させる細かい筒状変化（微絨毛）からなる。尿細管類似体上の刷子縁は、細胞表面に沿って形成される折りたたみまたはポケット内に続く、伸長した微絨毛表面を示す。細胞表面に平行だが、細胞表面下の折りたたみを通る組織切片は、細胞質に閉まれた微絨毛が並んだ路として現れる。刷子縁または微絨毛形成が並んだポケットは、微絨毛が多い立方体細胞が、そうでなければうろこ状の細胞培養環境中に、その広い頂端表面領域を維持する機構を代表する可能性がある。ポケットまたは路に連結した微絨毛がない細胞表面領域でも、細胞境界はまた、そこから突き出る長い微絨毛を有する。しかしその数は減少し、そしてその構造組織はポケットまたは路が隣接する表面と並んでいるのが観察される刷子縁とは異なる。微絨毛数が少ない領域は、正常の立方体尿細管細胞の側部および基底表面である可能性がある。

尿細管類似体は、損なわれていない（intact）近位尿細管細胞に典型的な細胞内組織を含む。細管細胞核は楕円であり、そして散在するヘテロクロマチンを中心に核周囲に含む。核物質の多くは、外見上ユークロマチンであり、1つまたは2つの仁が顕微鏡下で視覚化される。尿細管類似体細胞の細胞質は、しばしば細胞表面に平行に配置された多くの纖維状ミトコンドリアを含む。柵状のクリステは概して、ミトコンドリアの長軸に直角に配置されている。より伸長した細胞では、特に細胞内結合と連続して、細かい細胞質微纖維束および細胞質微纖維の広いネットワークもまた存在する。これらの纖維束は、細胞の側表面に平行に走っている。ほとんどの細胞で、粗面小胞体の側面は短いが、非常に長くなりうる細胞もある。他の細胞小器官には、密なリソソーム顆粒および立つゴルジネットワークがある。リソソーム内容物は培養を続けると有意に増加する可能性がある。

個々のデスマソームは、隣接する細胞との側縁に沿って接触部位に見られる可能性がある。より伸長した細胞群が单一の領域で接触する場所では、心筋の介在板に似た非常に複雑なデスマソーム様結合複合体が形成されることがある。これ

らの複合体から広い单一纖維のネットワークが放射状に作られる。これらの結合複合体は正常近位尿細管細胞の頂端境界の帶状デスマソームに似ている。したがって、これらの形態に基づき、尿細管類似体は近位尿細管の特徴をすべて有する

ことが明らかである。

遺伝子発現解析もまた、尿細管類似体が天然細管に典型的な遺伝子を発現することを示す。天然腎細管は尿細管の全長でオステオポンチンを発現し、そして近位端に優先的にアルカリ性ホスファターゼを発現する。単層培養腎細胞は、抗オステオポンチンおよび抗アルカリ性ホスファターゼ抗体をプローブとして切片を染色すると低いレベルの染色が見られる、非常に低いレベルのオステオポンチンおよびアルカリ性ホスファターゼ活性を示す。腎細胞が尿細管類似体に集合し始めるにつれ、アルカリ性ホスファターゼ活性は上昇する。単一尿細管類似体内で、この活性の分布は相同ではない。尿細管類似体の近位端では、検出可能なレベルのアルカリ性ホスファターゼが示される。細胞を、例えばトリプシンなどで分離すると、細胞は増強された活性を失い、そして最初の単層で見られた低いレベルに戻る。しかし、尿細管類似体構造に残った細胞は、増強された活性を保持する。増強された細胞細胞接触およびより組織に似た構造が、尿細管類似体に見られる増強された活性に貢献していると仮定される。

人工腎単位前駆体の移植

尿細管類似体が付着した封入多孔性メンブレン構造を含む、人工腎単位前駆体を、宿主に移植して、細管端で糸球体を形成することにより、ネフロン類似体形成を誘導してもよい。血管新生は人工腎臓機能に重要である。人工腎臓の機能および増殖は血管供給を必要とする。

血管新生において、宿主組織は人工腎臓細胞により産生される情報に反応する。この反応は、少なくとも3つの構成要素を含むようである。まず、尿細管類似体の毛細管内皮細胞が、存在する血管を囲む基底層を破る；血管新生の間、宿主の内皮細胞はプラスミノーゲン活性化因子などのプロテアーゼを分泌し、親毛細管または細静脈の基底層を破って消化を進める。次に、宿主内皮細胞が腎細胞に向かい移動する。第三に、内皮細胞が増殖し、そして尿細管類似体の近位端に形

成される糸球体様構造を灌流する、毛細管を形成する。その結果できる構造はネフロン類似体と称され、宿主に尿細管類似体を移植し、そして尿細管類似体の近位端に糸球体形成を誘導することにより、*in vivo*に形成される。糸球体形成は、移植2週間後までに、いくつかの尿細管類似体の端で見られる可能性がある。

移

植8週間後、糸球体形成は広がり、そしてほとんどの尿細管類似体上で見られるようになる。

人工腎単位前駆体は、新血管系形成を誘導する能力を有し、そして患者体内的血管化が少ないまたは多い領域のどちらに移植してもよい。皮下移植1週間後、血管形成は尿細管類似体の長さに沿って広がる。尿細管類似体は、細管および尿細管類似体の少なくとも1つの領域に形成される糸球体に沿った血管新生により、8週間後の終わりまでには、ネフロン類似体に発展する。複数の糸球体または糸球体様構造もまた、各尿細管類似体上に見られる。組織学的観察により、各尿細管類似体の長さに沿って広い血管形成が検出された。

調べたARUは、近位腎細管および糸球体の特徴を示す。ARUはアルカリ性ホスファターゼおよびガンマグルタミルトランスフェラーゼを発現する。ほぼ近位細管細胞でしか発現されない2つの遺伝子である。人工糸球体を機能的または免疫組織学的に試験すると、凝固因子VIIIの存在が示された。

血管供給がない人工腎臓は、栄養素供給を拡散に頼っているため、血管新生が適切な灌流を供給することが可能になるまで、厚さ数ミリメートル未満の生存層に限られる可能性がある。本発明の1つの態様は、この限界を、宿主に複数のARU構造を移植し、そして血管新生によりARUを動脈または静脈に連結させることにより克服する方法に向けられる。その後ARUを、動脈および静脈と共に宿主から除き、そして外科的により大きいまたはより厚いARUと組み合わせ、そして患者に再移植する。ARUの動脈および静脈を、患者の動脈および静脈と連結し、組み立てた人工腎臓に血液供給を提供する。

流出チャンネルの連結

ARUの流出チャンネルは、患者のどの部位に連結して、人工腎臓からの輸出液

を除去させてもよい。本発明の態様において、流出チャンネルを患者の器官に連結して、人工腎臓からのろ過液を除去させてもよい。流出チャンネルを、腎臓、尿管、膀胱、尿道、精巣、前立腺または輸精管を含む尿路に連結してもよい。また別に、流出チャンネルを大腸または小腸などの腸に、腸導管手術で連結してもよい。さらに、流出チャンネルは管により延長し、人工腎臓を移植した患者の皮膚から突き出してもよい。人工腎臓の腹部移植において、例えば、流出チ

ャンネルは腹壁を通して伸長されてもよい。流出チャンネルの端にキャップを取りつけ、輸出液の漏れを防いでもよい。望ましい時、患者がキャップをはずし、そして輸出液を外部に排出してもよい。

流出チャンネルの結合は縫合によってもよい。外科医によりARUを患者に取りつけることによりARUを適合させるためには、異なるARUの流出チャンネルが、異なる大きさを含んでもよい。それにより流出チャンネル結合部位に適合させることができ可能になる。さらに、流出チャンネルは、移植中、手術時の状況および部位に合うように簡単な適合が行える材質で構築されてもよい。

In vitro操作

本発明の別の態様において、人工腎臓をその動脈および静脈と共に宿主から除き、そしてin vitroで培養してもよい。ネフロン類似体を含む人工腎臓は、実験台上の生物反応器として実験台上の人工腎臓を形成するのに用いてもよい。In vitro人工腎臓は、哺乳動物血清を用いてまたは直接哺乳動物に連結することにより栄養を与えてもよい。In vitro人工腎臓の初期パイロット規模を、それに続く產生規模in vitro人工腎臓の開始物質としてもよい。例えば、付加的多孔性メンブレン構造を人工腎臓に結合させて、培養により大きく増殖するよう誘導してもよい。In vitro人工腎臓はその後、個々に合わせた治療産物として患者に移植してもよい。人工腎臓は、in vitroで、産物の大規模工業的加工および採取が可能になる程度まで、保存し、そして増殖させてもよい。例えば、in vitro人工腎臓をレニン製造に用いてもよい。

本発明の態様は、腎臓への物質の影響を解析するための人工腎臓の使用に向けられる。物質は薬剤(drug)または製薬(pharmaceutical)、化学物質、微生物、

生物学的産物または要素であってもよい。薬剤または製薬は、ヒトおよび動物を含む患者に、診断、治療、または疾患または他の異常状態の予防の一助として、使用されまたは投与されてもよい、すべて化学物質である。薬剤は痛みの緩和のため、またはいかなる生理学的または病理学的異常を制御したまたは改善するため用いられてもよい。薬剤の例には、ワクチン、組換え剤、化学物質、組換え核酸、組換えタンパク質、および生存、死亡または減弱微生物が含まれる。試験に用いられる薬剤には、候補薬剤、化学物質、薬剤の特性を行すると疑われる化合物および

および剤が含まれる。試験してもよい化学物質には、患者または腎臓が曝露される可能性があるすべての化学物質または物質が含まれる。こうした化学物質には、環境化学物質、個人の衛生用品および化粧品が含まれる。微生物には、細菌、真菌、ウイルス、アーベ、寄生虫、および酵母などの生存生命体すべて、または試験時に生存、死亡、仮死、不活発または減弱していてもよいそれに匹敵するものが含まれる。生物学的産物には、生存生命体が産生するタンパク質、脂質、核酸、糖、毒などの、生存生命体からの産物および廃棄産物が含まれる。

腎疾患の治療

本発明の1つの態様において、人工腎臓は外部で維持されそして操作され、そしてex vivoで機能してもよい。血液処理を要する患者は、一定期間、患者の血液供給を人工腎臓に連結してもよい。処理血液は、処理後、人工腎臓から分けられ、そして患者に戻されてもよい。

本発明の別の態様は、患者に人工腎臓を移植することにより、腎機能を増大させて、腎疾患を治療する方法に向けられる。腎疾患は一般的な用語であり、腎結石などそれほど生命に危険を与えない疾患から、腎多囊胞病およびネフローゼ、一時的および慢性および永久腎不全などの、より生命に危険を与える障害が含まれる。本発明の方法により治療される可能性がある腎疾患には、腎機能の増大により利益を受ける可能性がある疾患すべてが含まれる。腎囊胞形成異常、腎多囊胞病、髓質の囊胞疾患などの腎先天性異常、後天性(透析関連)囊胞病および単純囊胞；急性糸球体腎炎、三日月様糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、膜性糸球体腎炎、最小変化病(minimal change disease)、リボイドネフローゼ、巢状分節性

糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症、巣状増殖性糸球体腎炎、慢性糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、ヘーノホーチェーンライン紫斑病、細菌性心内膜炎、糖尿病性糸球体硬化症、アミロイドーシスおよび遺伝性腎炎などの糸球体疾患、急性細管壊死、急性腎不全などの細管疾患、および、微小血管障害性溶血性貧血、アテローム塞栓性腎疾患、鎌状細胞疾患腎症、拡散皮質壊死、腎梗塞、線腫、癌、後腎芽、免疫的伸介腎疾患、薬剤誘導腎炎、尿酸腎症、高カルシウム症および腎石灰症などのその他の腎疾患などである。

治療してもよいその他の疾患には、患者の腎臓が損傷を受ける可能性があるす

べての状態が含まれる。例えば、本発明の方法は、ネフロンに毒性を持つ薬剤による化学療法を受ける、健康な腎臓を持つ患者の治療に使用してもよい。治療を要する可能性があるその他の異常には、例えば、外傷、毒物摂取、自己免疫疾患、老齢、およびそれらに匹敵するものが含まれる。

本発明の方法は、患者の正規腎臓機能の増大が望ましい、いかなる腎疾患の治療にも有用である。人工腎臓は、腎機能増大の必要性が一時的かまたは永久であるかに依存して、限られた期間または永久に移植してもよい。

人工腎臓は、患者および移植部位の必要に合うように多くの異なる形状であってよい。例えば、患者に存在する腎臓が除かれない場合、伸長または平面またはコンパクトな形状が、腹部または皮下移植に最適である可能性がある。また別に、天然腎臓の解剖学的形状をとる人工腎臓は、腎置換が必要な患者には最も適している可能性がある。人工腎臓の大きさもまた、最適な成果をあげるために、さまざまであってもよい。大きな患者は大きい人工腎臓を必要とする可能性があり、一方、子供などの小さな患者は小さい人工腎臓により適している可能性がある。

本発明の他の態様および利点は、一部は以下の説明に明示され、そして一部はこの説明から明らかであろうし、そして本発明を実行することにより学ばれる可能性がある。

実施例

実施例1 腎細胞の単離

小さい腎臓および大きい腎臓の切片、1週齢のC57ブラックマウス由来などを、被膜を剥離し、切断し、切り刻み、そして15mM Hepes、pH7.4および0.5 μg/mlのインシュリン、1.0mg/mlのコラゲナーゼ、および0.5mg/mlのバシラス・ポリミキサル (Bacillus polymyxal) 由来の中性プロテアーゼ、ディスパーゼ (Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス) を含むダルベッコの修飾イーグル培地 (DMEM; Sigma、ミズーリ州セントルイス) に懸濁した。

大きい腎臓、ブタ腎臓などは、抽出の3時間以内に、無カルシウムイーグル最少必須培地を用い37°Cで10分、動脈灌流した。腎臓はその後、1.5mM MgCl₂ および1.5mM CaCl₂ を補った同じ緩衝液中の0.5mg/mlのコラゲナーゼ (Type IV, Sigma、ミズーリ州セントルイス) で灌流した。腎臓はその後、被膜を剥離し、

切断し、切り刻み、そして15mM Hepes、pH7.4および0.5 μg/mlのインシュリン、1.0mg/mlのコラゲナーゼ、および0.5mg/mlのバシラス・ポリミキサル由来の中性プロテアーゼ、ディスパーゼ (Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス) を含むダルベッコの修飾イーグル培地 (DMEM; Sigma、ミズーリ州セントルイス) に懸濁した。

大きいまたは小さい腎臓由来のものどちらかの腎細胞懸濁を、ウォーターパス中で、37°Cで30分、穏やかに攪拌した。細胞および破片は50g、5分の遠心分離により回収された。沈殿はタンパク質分解を止めるため10%ウシ胎児血清 (Biowhittaker、メリーランド州ウォーカーズビル) を含むDMEMに再懸濁し、そして濁った溶液を無菌80メッシュナイロンスクリーンに通し、大きな破片を除いた。細胞は遠心分離により回収し、そして無カルシウムダルベッコの修飾イーグル培地で2回洗浄した。

実施例2 腎細胞のin vitro培養

ラット尾コラーゲンの単離

ラット尾から腱を除き、そして50ml試験管の0.12M酢酸を含む脱イオン水に貯蔵した。4°Cで16時間、…晩保存した。

透析バッグは孔サイズが均一であり、そして重金属が除かれたことを確実にするため前処理した。簡潔には、透析バッグを2%炭酸水素ナトリウムおよび0.05%

EDTAの溶液に沈め、そして10分間煮沸した。蒸留水で複数回リヌスし、炭酸水素ナトリウムおよび0.05% EDTAを除いた。

ラット腱を含む0.12M酢酸溶液を処理した透析バッグに入れ、そして酢酸を除くため2から3日透析した。透析溶液は3から4時間おきに交換した。

多孔性メンブレン構造のコラーゲンによる処理

多孔性メンブレン構造(図4)は、約30μg/mlのコラーゲン(Vitrogenまたはラット尾コラーゲン)、約10μg/mlのヒトフィプロネクチン(Sigma、ミズーリ州セントルイス)および約10μg/mlのウシ血清アルブミン(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を含む溶液を、総容積約2mlの補足培地と、37°Cで3時間インキュベーションして接触させ、処理した。その後、コラーゲンでコーティングされた多孔性メンブレン構造を、1mlの濃縮水酸化アンモニウム(約28%から

約30%のNH₄OH、Sigma、ミズーリ州セントルイス)と共に30分インキュベーターに置き、pHを上げ、そしてコラーゲンのゲル化を促進した。多孔性メンブレン構造の水酸化アンモニウム処理後、構造を等張培地でよく洗浄し、使用前に多孔性メンブレン構造のpHを中性化した。

組織培養プレートのコーティング

培養フラスコ75cm²は、約30μg/mlのコラーゲン(Vitrogenまたはラット尾コラーゲン)、約10μg/mlのヒトフィプロネクチン(Sigma、ミズーリ州セントルイス)および約10μg/mlのウシ血清アルブミン(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を含む溶液を含む、総容積約2mlの補足培地中で、37°Cで3時間インキュベーションすることにより、コーティングした。

細胞培養

消化された単一懸濁腫細胞は、修飾コラーゲンマトリックス上に、約1×10⁶細胞/mlの濃度でまき、そして約10%のウシ胎児血清、約5μg/mlのウシインシリン、約10μg/mlのトランスフェリン、約10μg/mlの亜セレン酸ナトリウム、約0.5μMのヒドロコルチゾン、約10ng/mlのプロスタグランジンE₂、約100ユニット/mlのペニシリンG、約100μg/mlのストレプトマイシン(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を補ったDMEM中で、約37°C、5%CO₂のインキュベーターで培養した

集密した単層は、約0.05%のトリプシン、約0.53mMのEDTA (Gibco BRL、ニューヨーク州グランドアイランド) を含む無カルシウムイオンリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (約1.51mMのKH₂PO₄、約155.17mMのNaCl、約2.8mMのNa₂HPO₄·7H₂O) で処理することにより、継代培養した。

細胞は、懸濁から最初の継代以降、どの時点でも、約10%DMSOを含む培地で培養し、液体培地中で凍結および貯蔵してもよい。

実施例3 人工腎臓の調製

腎細胞は10日間in vitroで培養し、そして増殖させた。In vitro培地、10%のウシ胎児血清、5 μg/mlのウシインシュリン、10 μg/mlのトランスフェリン、10 μg/mlの亜セレン酸ナトリウム、0.5 μMのヒドロコルチゾン、10ng/mlのプロスタグランジンE₁、100ユニット/mlのペニシリンG、100 μg/mlのストレプ

トマイシン (Sigma、ミズーリ州セントルイス) を補ったDMEMは、1日おきに交換した。細胞は、0.05%トリプシン、約0.53mM EDTA (Gibco BRL、ニューヨーク州グランドアイランド) を含む無カルシウムイオンリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (約1.51mMのKH₂PO₄、約155.17mMのNaCl、約2.8mMのNa₂HPO₄·7H₂O) を用いたトリプシン処理により、採取した。37°Cで10分消化した後、細胞をおよそ5 x 10⁶ 細胞/mlでDMEM培地に再懸濁した。

細胞懸濁を、ポリカーボネート膜で構築された、容器に続くシラスティック (silastic) カテーテルに一端が連結された、4ミクロン孔サイズの前もって形成された細管装置を含む、多孔性メンブレン構造上に、穩やかに重層した。多孔性メンブレン構造はラットコラーゲンによりコーティングされた(実施例2)。多孔性メンブレン構造表面の1平方センチメートル当たり、およそ10⁷ 細胞が重層された多孔性メンブレン構造を、約30分から約40分、37°C、5%CO₂下でインキュベーションした。インキュベーション時間の終わりに、さらに前もって温めた培地を穩やかに加え、多孔性メンブレン構造を沈めた。多孔性メンブレン構造は、37°C、5%CO₂下で約7日から約10日インキュベーションした。培地を交換し、そして細胞には頻繁に、例えば約毎日、約2日ごとまたは約3日ごとなどに栄養

を与えた。

植付けてから約7から約10日後、人工腎単位前駆体が多孔性メンブレン構造表面に発達した。In vitro培養の30日後、液体が観察され、多孔性メンブレン構造の容器に集められた。In vitro培地は、フェノールレッドのため赤いが、容器中の液体は透明で、そして無色であった。集められた液体が培地と異なることにより、人工腎単位前駆体がろ過または分泌機能を示すことを示している。

人工腎単位前駆体の移植

植付けてから約7から10日後、表面に人工腎単位前駆体を含む多孔性メンブレン構造のいくつかを、無胸腺マウスの皮下空間に移植した。無胸腺マウスは、メイン州バー・ハーバーのJackson Laboratoriesなどの供給者から商業的に購入してもよい。移植してから約2、約4および約8週間後に動物を屠殺し、そして人工腎単位前駆体を回収して、そして解析した。

回収した標本は、全般的およびヘマトキシリソおよびエオジンにより組織学的

に調べた。オステオポンチン、フィプロネクチンおよびアルカリ性ホスファターゼの免疫組織化学染色を行い、細胞の型およびそのin vivoでの構造を決定した(図5、6、7)。ヒトフィプロネクチンモノクローナル抗体(Sigma、ミズーリ州セントルイス)をフィプロネクチンマトリックスに対して用いた。ローダミン結合ヤギ抗マウス(Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)を二次抗体として用いた。オステオポンチンの免疫細胞化学染色(図5)は我々の研究室で産生されたポリクローナル抗体を用いて行った。抗体は、ニュージーランドシロウサギ(New Zealand white rabbit)で標準的方法(HarlowおよびLane, Antibodies a laboratory manual, 1988, Cold Spring Harbor Press, コールドスプリングハーバー)を用いて産生され、そして1:5000の希釈率で使用した。FITCに結合したヤギ抗ウサギ抗体(Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)を二次抗体として用いた。アルカリ性ホスファターゼの免疫組織化学染色は、ニトロブルー、テトラゾリウムおよび5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を用いて行った。人工腎臓から集められたろ過液の色は、淡黄色であった。ろ過液の尿酸レベル解析は尿酸検出

キット (Sigma Diagnostics、ミズーリ州セントルイス) を用いて行った。

すべての動物は、屠殺するまで生存していた。回収した標本は元の構造を維持した。人工腎単位前駆体は、全体に宿主組織で覆われていた。人工腎臓中の液体は、膜に連結したカテーテル中に集められた。移植人工腎臓を組織学的に調べると、広範な血管形成、糸球体形成(図8)および非常に組織化された細管様構造が見られた。主に近位および遠位細管細胞から分泌されるオステオポンチンに対する抗体により免疫組織化学染色すると、細管部が陽性に染色された。アルカリ性ホスファターゼに対する免疫組織化学染色により、近位細管様構造が陽性に染色された。さらに、新規に形成された細管の細胞外マトリックス中に均一なフィプロネクチンの染色が見られた(図6)。新規に形成された腎単位から回収された黄色の液体は、66mg/dlの尿酸を含んでおり、血漿中の2mg/dlと比べると、これらの細管が尿酸の一方向分泌および濃縮を行うことが可能であることを示唆している。糸球体形成の証拠、組織学的染色および尿酸分泌により、移植7日後までに、人工腎単位前駆体はARUに発達していることが示される。

尿細管類似体および天然細管の表現型比較

腎臓の近位尿細管細胞の形状は立方体である。これらは1つまたは2つの目立つ仁を含む、中心に配置された円から楕円の核を含む。細胞の頂端表面は、長細い指状の微絨毛を形成し、ラットなどの動物では高さ1.3mmに達しそして頂端表面領域をおよそ22倍に増加させる。これに比べ、遠位曲尿細管は、通常、頂端表面に短くすんぐりした微絨毛を含み、そして集合管には刷子縁がない。

尿細管類似体の細胞は、天然尿細管に似ている。人工尿細管細胞は、表面陷入部に続く長細い微絨毛の長い刷子縁を有する。培養細胞の微絨毛密度は、*in vivo*の近位細管細胞に見られるものに匹敵する。近位細胞の側面および基底部の境界は、非常に不規則で、そして隣接する細胞と広く絡み合っている。これは培養細胞で観察されるものと似ている。

近位細管細胞の1つの特徴は、多数の培養細胞でも見られる、多数のリソソーム、ファゴソームおよびペルオキシソームの存在である。近位細管細胞の刷子縁に対するマーカー酵素である、アルカリ性ホスファターゼおよびガンマグルタミ

ルトランスフェラーゼ活性が、長期間の培養に渡り維持されるのは、人工尿細管の同一性および完全性のさらなる証拠である。

本発明の他の態様および使用は、本明細書に開示される本発明の明細および実行を考慮すれば、当業者には明らかであろう。本明細書中に述べられたすべての米国特許および他の参考文献は明確に本明細書に援用される。明細および実施例は、以下の請求項に示される、本明細書の真の範囲および精神のみを模範として考慮すべきである。

【図1】



FIG. IA

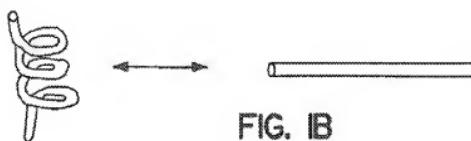


FIG. IB

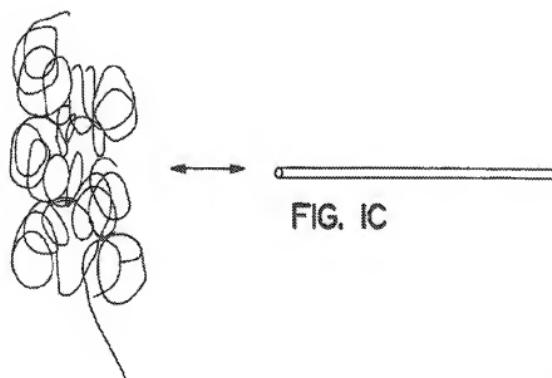


FIG. IC

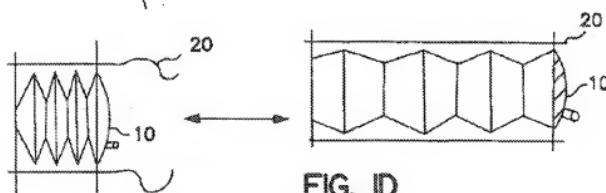


FIG. ID

【図2】

FIG. 2A

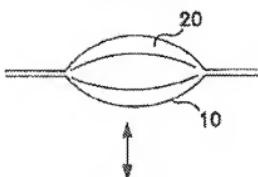


FIG. 2B

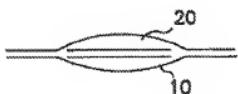
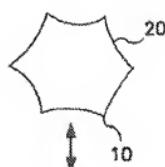


FIG. 2C

【図3】



FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 3D



FIG. 3E



FIG. 3F

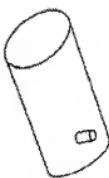


FIG. 3G

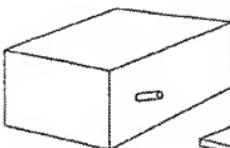


FIG. 3H

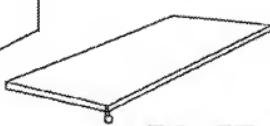


FIG. 3I



FIG. 3J

【図4】

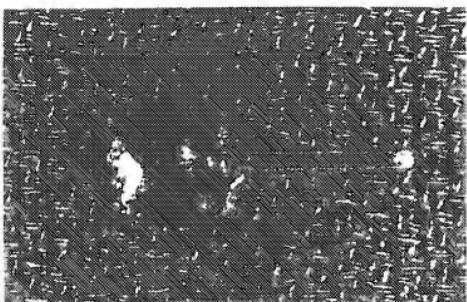


FIG. 4

【図5】

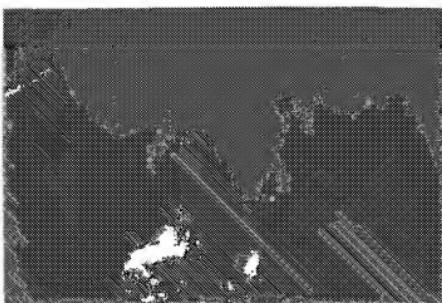


FIG. 5

【図6】

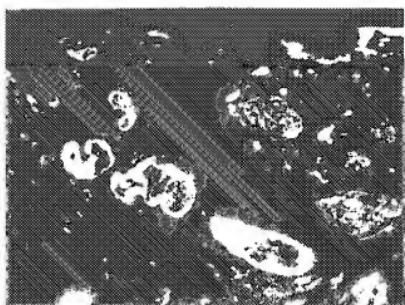


FIG. 6

【図7】

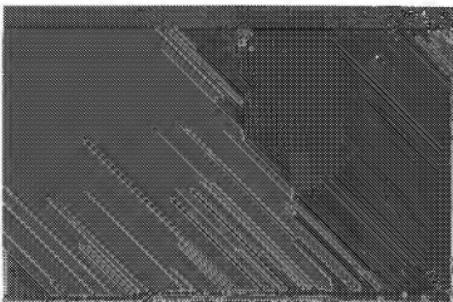


FIG. 7A

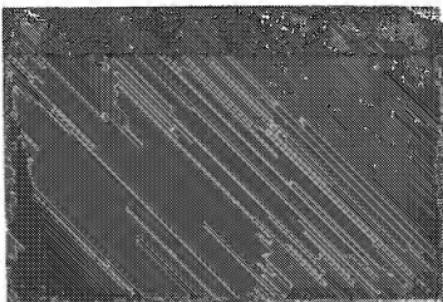


FIG. 7B

【図8】

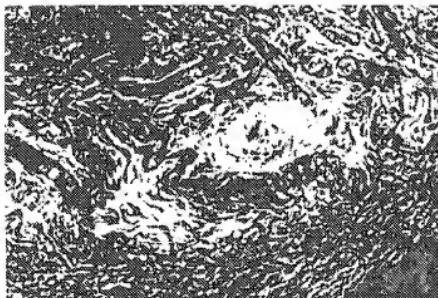


FIG. 8A

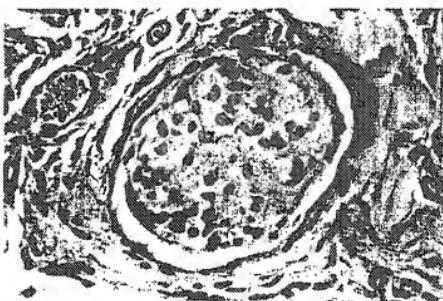


FIG. 8B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 97/15470
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC6: A61F 2/02, C12N 5/00, A61G 27/00 <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>		
B. FIELDS SEARCHED		
<small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> IPC6: A61F, C12N <small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the fields searched</small>		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ¹	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5549674 A (H. DAVID HUMES ET AL), 27 August 1996 (27.08.96), see column 2, line 56 - column 3, column 5-6, column 15, lines 3-15 and figures 1c, 2, 5, 6	1-13, 15-18, 20-52, 57-53, 66-83
A	...	53-6
A	US 5429938 A (H. DAVID HUMES), 4 July 1995 (04.07.95), see example 1	1-83
A
A	US 4769037 A (ROBERT J. MIDCALF), 6 Sept 1988 (06.09.88), See figures 3-6	1, 6, 15-23

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See parent family sheet.
<small>* Special categories of cited documents</small> <small>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small> <small>"B" other documents not published before or after the international filing date</small> <small>"C" documents within the priority status (priority status) or which is cited in examination or opposition, date of sealing status or other special reason (as specified)</small> <small>"D" documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other events</small> <small>"P" documents published prior to the international filing date for test that the priority date claimed</small>		
<small>"T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small> <small>"X" documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered valid or cannot be considered to derive from the cited status when the document is cited as prior art</small> <small>"Y" documents of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to derive from the cited status when the document is cited with the document other than as prior art</small> <small>"Z" document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 December 1997		15 January 1998 (15.01.98)
<small>Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 3018 Patentlan 2 NL-2285 HV Rijswijk Tl. +31-70 340-2048, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 346-3016</small>		<small>Authorized officer</small> Carl-Olof Gustafsson

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 97/15470

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9307913 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER CORPORATION), 29 April 1993 (29.04.93), see pages 8-14 and claims 8 and 12 --	1-3, 12
A	US 5516680 A (GAIL K. NAUGHTON ET AL), 14 May 1996 (14.05.96), see claims, figure 5 --	1, 3, 18, 31, 58
A	Dialog Information Services, file 154, MEDLINE, Dialog accession no. 08322012, Medline accession no. 95345386, Courjault-Gautier F et al: "J Am Soc Nephrol May 1995, 5 (11) p1949-63 --	8-11
A	Dialog Information Services, file 73, ENBASE, Dialog accession no. 10055677, Medline accession no. 96257381, Fourcier H. et al: "Biological molecule-impregnated polyester: An in vivo angiogenesis study"; & Biomaterials, 1996, 17/17 (1659-1665) --	12
A	Dialog Information Services, file 154, MEDLINE, Dialog accession no. 06560006, Medline accession no. 91029709, Boegard PJ et al: "Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity"; & Chem Biol Interact 1990, 76 (3) p251-91 --	1, 79-83
A	Dialog Information Services, file 34, SciSearch, Dialog accession no. 14919457, Humes HD et al: "Tubulogenesis from isolated single cells of adult mammalian kidney - clonal analysis with a recombi- nant retrovirus"; & American Journal of Physiology- Renal fluid and electrolyte physiology, 1996, V40, N1 (JUL), PF42-F49 --	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 97/15470

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage Relevant to claim No.
A	Dialog Information Services, file 154, MEDLINE, Dialog accession no. 09755050, Medline accession no. 95358356, Genestie I et al: "Polarity and transport properties of rabbit kidney proximal tubule cells on collagen IV-coated porous mem- branes"; & Am J Physiol Jul 1995, 269 (1 Pt 2) pF22-30 -----
A	Laboratory Investigation, Volume 64, No 4, 1991, H. David Humes et al, "Effects of Transforming Growth Factor-beta, Transforming Growth Factor-alpha, and Other Growth Factors on Renal Proximal Tubule Cells" page 538 -----
A	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 87, May 1990, Mary Taub et al, "Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium" page 4002 - page 4006 -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 97/15470

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 53-56
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 53-56 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/diagnostic methods practiced on the human or animal body/Rule 39.1.(iv).
Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(i).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

02/12/97

PCT/US 97/15470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5516680 A	14/05/96	US 5443950 A	22/08/95
		US 5460939 A	24/10/95
		US 5518254 A	23/04/96
		US 5512475 A	30/04/96
		US 5516681 A	14/05/96
		US 5518915 A	21/05/96
		US 5541107 A	30/07/96
		US 5578485 A	26/11/96
		US 5589781 A	03/12/96
		US 5624840 A	29/04/97
		US 5266486 A	30/11/93
		AU 4211489 A	02/04/90
		CA 1335657 A	23/05/95
DK	40591 A		07/05/91
EP	0268566 A		14/03/90
IL	91536 A		31/10/96
JP	4501657 T		26/03/92
KZ	230572 A		23/12/93
US	5032508 A		16/07/91
US	5160496 A		03/11/92
WO	9002796 A		22/03/90
US	4963489 A		16/10/90
AT	127692 T		15/09/95
AU	615414 B		03/10/91
AU	6815990 A		14/03/91
AU	6816090 A		14/03/91
AU	7356867 A		09/11/87
BG	51337 A		15/04/93
CA	1310926 A		01/12/92
DE	3751519 D,T		28/03/96
DK	665687 A		17/12/87
EP	0309456 A,B		05/04/89
FI	100249 B		00/00/00
GR	88100216 A		31/01/89
IL	85957 A		24/06/94
JP	1503195 T		02/11/89
ND	179181 B,C		13/05/96
WO	8706120 A		22/10/87
US	4721086 A		26/01/88
AU	595813 B		12/04/90
AU	5985086 A		22/10/87
CA	1282725 A		09/04/91
EP	0241578 A		21/10/87
JP	62249926 A		30/10/87

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International application No. PCT/US 97/15470
			02/12/97
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5549674 A	27/08/96	AU 7970194 A CA 2173594 A EP 0746343 A JP 9503941 T US 5686289 A WO 9511048 A AU 671622 B CA 2131305 A EP 0629129 A JP 7504323 T US 5429938 A WO 9317696 A	08/05/95 27/04/95 11/12/96 22/04/97 11/11/97 27/04/95 05/09/96 16/09/93 21/12/94 18/05/95 04/07/95 16/09/93
US 5429938 A	04/07/95	AU 671622 B CA 2131305 A EP 0629129 A JP 7504323 T US 5549674 A WO 9317696 A	05/09/96 16/09/93 21/12/94 18/05/95 27/08/96 16/09/93
US 4769037 A	06/09/88	NONE	
WO 9307913 A1	29/04/93	AU 2900792 A US 5567612 A	21/05/93 22/10/96

プロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L
U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S
D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG
, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT
, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA,
CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, F
I, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE
, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, M
X, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE
, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA,
UG, US, UZ, VN, YU

(72) 発明者 アシュカー, サミー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115,

ボストン, ストーンホルム・ストリート

12, アパートメント 606

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第2区分

【発行日】平成17年5月12日(2005.5.12)

【公表番号】特表2001-506871(P2001-506871A)

【公表日】平成13年5月29日(2001.5.29)

【出願番号】特願平10-512833

【国際特許分類第7版】

A 61 M 1/14

A 61 F 2/02

C 12 N 5/06

G 01 N 33/15

G 01 N 33/50

【F I】

A 61 M 1/14 5 0 0

A 61 F 2/02

G 01 N 33/15 Z

G 01 N 33/50 Z

C 12 N 5/00 E

【手続補正書】

【提出日】平成16年9月6日(2004.9.6)

【手続補正】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手 続 换 正 書

平成16年 9月 6日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

平成10年 特許願 第512833号

2. 换正をする者

名 称 チルドレンズ・メディカル・センター・コーポレーション

3. 代理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区
ユアサハラ法律特許事務所

電 話 3270-6641~6646

氏 名 (8970) 弁理士 村 本 一 夫



住 所 同 所

担当者 氏 名 (9288) 弁理士 村 上 清



4. 换正対象書類名

明細書

請求の範囲

5. 换正対象項目名

明細書

請求の範囲

6. 换正の内容

別紙の通り



(別紙)

(1) 請求の範囲を以下の通り補正する。

『1. 少なくとも一つの人工腎単位を含む人工腎臓であって、前記人工腎単位は少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外側表面を有する多孔性メンブレン構造を含み、そして前記メンブレン構造がさらにその外側表面に付着し、そして複数のネフロン類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行っており、前記各ネフロン類似体は血管新生を有し前記尿細管類似体の少なくとも一つの領域において糸球体様構造を形成する尿細管類似体を含み、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記集合体が前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔からなり、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す、前記人工腎臓。

2. 多孔性メンブレン構造が、セルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ・4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリブロビレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、請求項1の人工腎臓。

3. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項1の人工腎臓。

4. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項1の人工腎臓。

5. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、請求項1の人工腎臓。

6. 多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項1の人工腎臓。
7. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、請求項1の人工腎臓。
8. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、請求項7の人工腎臓。
9. 前記人工腎臓が *in vivo* または *ex vivo* において機能する、請求項1の人工腎臓。
10. 刷子線が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項1の人工腎臓。
11. 細胞集合体がオステオボンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項1の人工腎臓。
12. 細胞集合体がフィプロネクチンを発現する、請求項1の人工腎臓。
13. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項1の人工腎臓。
14. 前記流出チャンネルが前記多孔性メンブレン構造中に体液が進入することを防ぐように位置取りされた非透流性バルブを含む、請求項1の人工腎臓。
15. 前記流出チャンネルが半多孔性のメンブレンバルブを含み、前記半多孔性メンブレンが微生物の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項1の人工腎臓。
16. 少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を含む人工腎単位であって、前記メンブレン構造がさらにその外部表面に付着しそして複数のネフロン類似体であるその封入された内部空間と液体伝達を行い、前記各ネフロン類似体は前記尿細管類似体を含み、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記集合体は前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子線を示す、前記人工腎単位。
17. 多孔性メンブレン構造が、セルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリ

アクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリブロビレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、請求項1 6の人工腎単位。

18. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項1 6の人工腎単位。

19. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項1 6の人工腎単位。

20. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、請求項1 6の人工腎単位。

21. 多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、請求項1 6の人工腎単位。

22. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、請求項1 6の人工腎単位。

23. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、請求項1 6の人工腎単位。

24. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項1 6の人工腎単位。

25. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項1 6の人工腎単位。

26. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項1 6の人工腎単位。

27. 前記人工腎単位がin vivoまたはex vivoにおいて機能する、請求項1 6

の人工腎単位。

28. 前記人工腎単位が前記封入空間中に尿酸を排出する、請求項16の人工腎単位。

29. 封入内部空間を定める外部表面を有しそして少なくとも一つの流出チャネルを有する多孔性メンブレン構造を含む、追加的な腎臓機能を必要とする患者に対して移植するために適した人工腎単位前駆体であって、前記メンブレン構造がさらにその外部表面に付着しそしてさらに複数の尿細管類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行い、前記尿細管類似体が尿細管細胞の三次元集合体を含み、前記集合体が前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達をするための管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す、前記人工腎単位前駆体。

30. 多孔性メンブレン構造が、セルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ・4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

31. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、請求項29の人工腎単位前駆体。

32. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、請求項29の人工腎単位前駆体。

33. 多孔性メンブレン構造が直徑約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を

含む、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

3 4. 多孔性メンブレン構造が直径約 0.4 ミクロンから約 4 ミクロンの孔を含む、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

3 5. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

3 6. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、請求項 3 5 の人工腎単位前駆体。

3 7. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

3 8. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

3 9. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

4 0. 前記人工腎単位が前記封入空間中に尿酸を排出する、請求項 2 9 の人工腎単位前駆体。

4 1. 以下の段階：

a) 少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を提供する段階；

b) 前記外部表面を腎臓組織細胞の懸濁物と接触させる段階；そして

c) 前記腎臓細胞を *in vitro* において前記外部表面上で培養して複数の尿細管類似体を形成する段階であって、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元集合体を含み、前記集合体は前記メンブレン構造の封入空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す段階；

を含む、追加の腎臓機能を必要とする患者体内に移植するために適した人工腎単位前駆体を作成する方法。

4 2. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、請求項 4 1 の方法。

4 3. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、請求

項 4 1 の方法。

4 4. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項 4 1 の方法。

4 5. 尿細管類似体がフィプロネクチンを発現する、請求項 4 1 の方法。

4 6. 尿細管細胞が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、請求項 4 1 の方法。

4 7. 腎臓細胞が胎児腎臓細胞、または幼若体 (juvenile) の腎臓細胞である、請求項 4 1 の方法。

4 8. 腎臓細胞が腎臓皮質由来である、請求項 4 1 の方法。

4 9. 腎臓細胞がヒトのものである、請求項 4 1 の方法。

5 0. 封入多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする、請求項 4 1 の方法。

5 1. 封入多孔性メンブレン構造が直径約 0.04 ミクロンから約 10 ミクロンの孔を含む、請求項 4 1 の方法。

5 2. 封入多孔性メンブレン構造が直径約 0.4 ミクロンから約 4 ミクロンの孔を含む、請求項 4 1 の方法。

5 3. 内部空間を定める外部表面を有する生体適合性ポリマーの半透性膜を含む人工腎臓のための多孔性メンブレン構造であって、前記メンブレン構造がヘッダーと液体伝達を行う複数の中空チューブを含み、そして前記ヘッダー上の流出チャンネルが前記内部空間のドレナージを可能にする、前記多孔性メンブレン構造。

5 4. 以下の段階：

a) 腎臓組織を単離する段階；

b) 前記腎臓組織を酵素的処理により分離して細胞懸濁物を形成する段階；

c) 前記腎臓細胞懸濁物を *in vitro* において培養する段階；

d) 封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質で処理する段階；

e) 前記腎臓細胞を封入多孔性メンブレンの処理した外部表面上で培養して尿細管類似体を形成する段階であって、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細

胞集合体内に管腔を有する腎臓細胞の集合体内に管腔を含み、そして前記尿細管細胞は刷子線を示す、前記段階；

を含む、尿細管類似体を作成する方法。

55. 以下の段階：

a) 封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質でコーティングする段階；

b) 腎臓細胞懸濁物を前記物質上に播く段階；

c) 前記腎臓細胞を前記封入多孔性メンブレン上で培養して尿細管を形成する段階であって、前記尿細管は内部に管腔を含む尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、そして前記尿細管細胞は刷子線を示す、前記段階；

を含む、腎臓細胞上の物質の効果を測定する方法。

56. 以下の段階：

a) 物質を尿細管類似体細胞培養物に接触させる段階であって、前記尿細管類似体は多孔性メンブレンが付着し内部に管腔を有する尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記尿細管が刷子線を示す、前記段階；そして

b) 前記腎臓細胞に対する物質の効果を決定する段階；

を含む、腎臓細胞に対する物質の効果を測定する方法。』

(2) 明細書第34頁末行の後に、行を変えて下記の文章を挿入する。

『本発明の具体的な態様には次のものが含まれる。

1. 少なくとも一つの人工腎単位を含む人工腎臓であって、前記人工腎単位は少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外側表面を有する多孔性メンブレン構造を含み、そして前記メンブレン構造がさらにその外側表面に付着し、そして複数のネフロン類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行っており、前記各ネフロン類似体は血管新生を有し前記尿細管類似体の少なくとも一つの領域において糸球体構造を形成する尿細管類似体を含み、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記集合体が前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔からなり、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子線を示す、前記人工腎臓。
2. 多孔性メンブレン構造が、ルロースエーテル、セルロース、セルロースエスチル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、前項1の人工腎臓。
3. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、前項1の人工腎臓。
4. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、前項1の人工腎臓。
5. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、前項1の人工腎臓。

6. 多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、前項1の人工腎臓。
7. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、前項1の人工腎臓。
8. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、前項7の人工腎臓。
9. 前記人工腎臓がin vivoまたはex vivoにおいて機能する、前項1の人工腎臓。
10. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項1の人工腎臓。
11. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項1の人工腎臓。
12. 細胞集合体がフィプロネクチンを発現する、前項1の人工腎臓。
13. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、前項1の人工腎臓。
14. 前記流出チャンネルが前記多孔性メンブレン構造中に体液が進入することを防ぐように位置取りされた非還流性バルブを含む、前項1の人工腎臓。
15. 前記流出チャンネルが半多孔性のメンブレンバルブを含み、前記半孔性メンブレンが微生物の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、前項1の人工腎臓。
16. 少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を含む人工腎単位であって、前記メンブレン構造がさらにその外部表面に付着しそして複数のネフロン類似体であるその封入された内部空間と液体伝達を行い、前記各ネフロン類似体は前記尿細管類似体を含み、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記集合体は前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す、前記人工腎単位。
17. 多孔性メンブレン構造が、ルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルベンテン、ポリア

クリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキシジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、前項16の人工腎単位。

18. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、前項16の人工腎単位。
19. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、前項16の人工腎単位。
20. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、前項16の人工腎単位。
21. 多孔性メンブレン構造が直径約0.4ミクロンから約4ミクロンの孔を含む、前項16の人工腎単位。
22. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、前項16の人工腎単位。
23. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、前項16の人工腎単位。
24. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項16の人工腎単位。
25. 細胞集合体がオスティオボンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項16の人工腎単位。
26. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、前項16の人工腎単位。
27. 前記人工腎単位がin vivoまたはex vivoにおいて機能する、前項16の人工腎単位。

28. 前記人工腎単位が前記封入空間中に尿酸を排出する、前項16の人工腎単位。

29. 封入内部空間を定める外部表面を有しそして少なくとも一つの流出チャネルを有する多孔性メンブレン構造を含む、追加的な腎臓機能を必要とする患者に対して移植するために適した人工腎単位前駆体であって、前記メンブレン構造がさらにその外部表面に付着しそしてさらに複数の尿細管類似体であるその封入内部空間と液体伝達を行い、前記尿細管類似体が尿細管細胞の三次元集合体を含み、前記集合体が前記メンブレン構造の内部空間と液体伝達をするための管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子縁を示す、前記人工腎単位前駆体。

30. 多孔性メンブレン構造が、ルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ化ポリエチレン、フェノール類、ポリ・4-メチルベンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリル酸、ポリベンゾキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフッ化物、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーまたはそれらの物理的混合物から選択される生体適合性物質を含む、前項29の人工腎単位前駆体。

31. 多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、前項29の人工腎単位前駆体。

32. 多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして液体およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、前項29の人工腎単位前駆体。

33. 多孔性メンブレン構造が直径約0.04ミクロンから約10ミクロンの孔を含む、前項29の人工腎単位前駆体。

- 3 4. 多孔性メンブレン構造が直径約 0.4 ミクロンから約 4 ミクロンの孔を含む、前項 2 9 の人工腎単位前駆体。
- 3 5. 前記腎臓細胞集合体がほ乳類細胞を含む、前項 2 9 の人工腎単位前駆体。
- 3 6. 前記ほ乳類細胞が人細胞である、前項 3 5 の人工腎単位前駆体。
- 3 7. 刷子線が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項 2 9 の人工腎単位前駆体。
- 3 8. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項 2 9 の人工腎単位前駆体。
- 3 9. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、前項 2 9 の人工腎単位前駆体。
- 4 0. 前記人工腎単位が前記封入空間中に尿酸を排出する、前項 2 9 の人工腎単位前駆体。
- 4 1. 以下の段階：
 - a) 少なくとも一つの流出チャンネルを有する封入内部空間を定める外部表面を有する多孔性メンブレン構造を提供する段階；
 - b) 前記外部表面を腎臓組織細胞の懸濁物と接触させる段階；そして

前記腎臓細胞を *in vitro* において前記外部表面上で培養して複数の尿細管類似体を形成する段階であって、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元集合体を含み、前記集合体は前記メンブレン構造の封入空間と液体伝達を行う管腔を含み、そして前記集合体中の尿細管細胞が刷子線を示す段階；

を含む、追加の腎臓機能を必要とする患者体内に移植するために適した人工腎単位前駆体を作成する方法。
- 4 2. 刷子線が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項 4 1 の方法。
- 4 3. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項 4 1 の方法。
- 4 4. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シップ染色アッセイに陽性である、前項 4 1

の方法。

4 5. 尿細管類似体がフィブロネクチンを発現する、前項 4 1 の方法。

4 6. 尿細管細胞が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、前項 4 1 の方法。

4 7. 腎臓細胞が胎児腎臓細胞、または幼若体 (juvenile) の腎臓細胞である、前項 4 1 の方法。

4 8. 腎臓細胞が腎臓皮質由来である、前項 4 1 の方法。

4 9. 腎臓細胞がヒトのものである、前項 4 1 の方法。

5 0. 封入多孔性メンブレン構造が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする、前項 4 1 の方法。

5 1. 封入多孔性メンブレン構造が直径約 0.04 ミクロンから約 10 ミクロンの孔を含む、前項 4 1 の方法。

5 2. 封入多孔性メンブレン構造が直径約 0.4 ミクロンから約 4 ミクロンの孔を含む、前項 4 1 の方法。

5 3. 以下の工程：

a) 患者体内の天然血管供給を有する領域に、前項 2 9 の方法により作成した人工腎単位前駆体を移植する工程；

b) 天然血管供給を誘導して前記位置の領域において一またはそれ以上の糸球体様構造を形成する工程；そして

c) 前記メンブレン構造からの前記流出チャンネルを患者の泌尿器系に連結する工程；

を含む、前記患者において腎臓疾患を治療する方法。

5 4. 前記糸球体様構造が第 VIII 因子を発現する、前項 5 3 の方法。

5 5. 流出チャンネルが前記患者の尿管に接続される、前項 5 3 の方法。

5 6. 尿管が本来の尿管であるかまたは人工尿管である、前項 5 5 の方法。

5 7. 内部空間を定める外部表面を有する生体適合性ポリマーの半透性膜を含む人工腎臓のための多孔性メンブレン構造であって、前記メンブレン構造がヘッダーと液体伝達を行う複数の中空チューブを含み、そして前記ヘッダー上の流出チャンネルが前記内部空間のドレナージを可能にする、前記多孔性メンブレン構

造。

5 8. 半透膜が多孔性メンブレン構造が生物分解性物質を含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

5 9. 半透膜が細胞の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 0. 半透膜が直径約 0.04 ミクロンから約 10 ミクロンの孔を含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 1. 半透膜が直径約 0.4 ミクロンから約 4 ミクロンの孔を含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 2. 前記中空チューブが円形の横断面を有する、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 3. 円形状、單一コイル状、多重コイル (multiple coil) 状、満巻き (spiral) 状、球状、らせん (helix) 状、多重ヘリックス状、梢円状、平面状、U 字型、四角状、またはそれらの組合せの形状である、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 4. 前記流出チャンネルが前記多孔性メンブレン構造中に体液が進入することを防ぐように位置取りされた非還流性バルブを含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 5. 前記流出チャンネルが半多孔性のメンブレンバルブを含み、前記半多孔性メンブレンが微生物の通過を阻害し、そして体液およびガスの通過を可能にする孔サイズを有する、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 6. 前記多孔性メンブレン構造が機械的損傷から保護するための外側ケーシング (casing) をさらに含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 7. 流れ込み (affluent) チャンネルをさらに含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 8. 回収手段および前記流出チャンネルからの流出物貯蔵手段をさらに含む、前項 5 7 の多孔性メンブレン構造。

6 9. 以下の段階：

a) 腎臓組織を単離する段階；

b) 前記腎臓組織を酵素的処理により分離して細胞懸濁物を形成する段階；

- c) 前記腎臓細胞懸濁物を *in vitro* において培養する段階；
- d) 封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質で処理する段階；
- e) 前記腎臓細胞を封入多孔性メンブレンの処理した外部表面上で培養して尿細管類似体を形成する段階であって、前記尿細管類似体は尿細管細胞の三次元細胞集合体内に管腔を有する腎臓細胞の集合体内に管腔を含み、そして前記尿細管細胞は刷子縁を示す、前記段階；
を含む、尿細管類似体を作成する方法。
 - 7 0. 細胞外マトリックスがコラーゲンを含む、前項 6 9 の方法。
 - 7 1. コラーゲンがラットの尾のコラーゲンである、前項 6 9 の方法。
 - 7 2. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項 6 9 の方法。
 - 7 3. 細胞集合体がオステオボンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項 6 9 の方法。
 - 7 4. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、前項 6 9 の方法。
- 7 5. 以下の段階：
 - a) 封入多孔性メンブレン構造を細胞外マトリックスタンパク質でコーティングする段階；
 - b) 腎臓細胞懸濁物を前記物質上に播く段階；
 - c) 前記腎臓細胞を前記封入多孔性メンブレン上で培養して尿細管を形成する段階であって、前記尿細管は内部に管腔を含む尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、そして前記尿細管細胞は刷子縁を示す、前記段階；
を含む、腎臓細胞上の物質の効果を測定する方法。
- 7 6. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項 7 5 の方法。
- 7 7. 細胞集合体がオステオボンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項

75の方法。

78. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、前項75の方法。

79. 以下の段階：

a) 物質を尿細管類似体細胞培養物に接触させる段階であって、前記尿細管類似体は多孔性メンブレンが付着し内部に管腔を有する尿細管細胞の三次元細胞集合体を含み、前記尿細管が刷子縁を示す、前記段階；そして

b) 前記腎臓細胞に対する物質の効果を決定する段階；

を含む、腎臓細胞に対する物質の効果を測定する方法。

80. 物質が薬物、医薬品、化学物質、微生物、化学物質、または元素である、前項79の方法。

81. 刷子縁が前記腎臓細胞の自由表面上に多数の微絨毛を含む、前項79の方法。

82. 細胞集合体がオステオポンチンを発現し、そして前記集合体の少なくとも一つの領域における尿細管細胞がアルカリ性ホスファターゼを発現する、前項79の方法。

83. 細胞集合体が過ヨウ素酸-シッフ染色アッセイに陽性である、前項79の方法。』